

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019461

International filing date: 17 December 2004 (17.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-420046  
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18.02.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 2 月 1 7 日  
Date of Application:

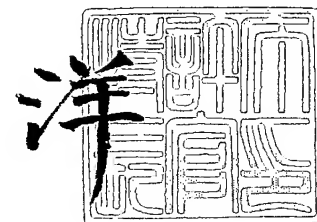
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 4 2 0 0 4 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 4 2 0 0 4 6 ]

出      願      人                      サントリー株式会社  
Applicant(s):                      サントリーフラワーズ株式会社

2 0 0 5 年    3 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 1034724  
【提出日】 平成15年12月17日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/29  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 - 1 - 1 サントリー株式会社 研究センター内  
    【氏名】 田中 良和  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 - 1 - 1 サントリー株式会社 研究センター内  
    【氏名】 小埜 栄一郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 - 1 - 1 サントリーフラワーズ株式会社 研究センター内  
    【氏名】 中村 典子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台 1 - 1 - 1 サントリーフラワーズ株式会社 研究センター内  
    【氏名】 水谷 正子  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001904  
    【氏名又は名称】 サントリー株式会社  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502275942  
    【氏名又は名称】 サントリーフラワーズ株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100099759  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 青木 篤  
    【電話番号】 03-5470-1900  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100077517  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石田 敬  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087871  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 福本 積  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082898  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 西山 雅也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 209382  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0306634

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

**【請求項 2】**

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 3】**

配列番号 1 に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 4】**

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

**【請求項 5】**

配列番号 1 に記載する塩基配列の一部または全部からなる DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 6】**

ゴマノハグサ科由来である請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子。

**【請求項 7】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

**【請求項 9】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質。

**【請求項 10】**

請求項 7 に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織。

**【請求項 12】**

請求項 11 に記載の植物体の切り花。

**【請求項 13】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いてカルコン類の4' 位に糖を転移する方法。

**【請求項 14】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体。

**【請求項 15】**

花色が黄色味を帯びていることを特徴とする請求項 14 に記載の植物体。

**【請求項 16】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項 17】**

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項 18】**

請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項 19】**

請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】フラボノイド合成系の制御による黄色の花の作製方法

【技術分野】

【0001】

本発明はカルコン類に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、および当該遺伝子を利用して花色が変換された植物に関するものである。更に詳しくは、カルコン類の4' 配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくはキンギョソウのカルコン類の4' 配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、及びこれらとオーレウシジン合成酵素（以下、ASという）遺伝子を共発現させオーロン類を蓄積させることにより花の色を黄色く改変する手法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

花色は人が花卉を鑑賞あるいは購入する際に重要な形質であり、古くから様々な色の花が育種されてきた。単一の種ですべての色の花をもつ場合はむしろ稀であるが、これは花色として発現する色素の生合成が遺伝的に規定されていることによる。交配育種では利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によって目的の種においてすべての色の花を作成することは実質的に不可能であった。最近になって、遺伝子組換え技術を利用して、花色素を合成する遺伝子のある植物から取得し、当該遺伝子を別の種で発現することにより花の色を改変することが可能となった(Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)、Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001))。

【0003】

花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと総称されるフラボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物種の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、黄色カーネーションには4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン（以下THC）の2' 配糖体が花卉中に存在することが知られている（Phytochemistry 5,111 (1996)）。また、キンギョソウ、リナリアにはTHCの4' 配糖体が存在する。

【0004】

カルコン類としては、THCのほか、プテイン、イソリクイチゲニン等及びこれらの誘導体の配糖体が知られており、カーネーション、アサガオ、ボタン、アスター、ムギワラギク、ニチニチソウ、シクラメン、ペチュニアはTHC、キンギョソウやスターチスは3,4,2',4',6' - ペンタヒドロキシカルコン、コスモス、キクイモはプテイン、ダリアはプテインおよびイソリクイチゲニンをアグリコンとする配糖体を含んでいる。また、キンギョソウ、リナリア、アサガオなどの限られた種にはオーレウシジン（以下AU）、ブラックテアチンなどのオーロン類と呼ばれる黄色の花色素が存在する。

【0005】

オーロンの吸収極大は399nmから403nmであるのに対し、カルコンの吸収極大は372nmから382nmであるから、両者の色調は異なり、蛍光のためオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈する（バイオホルティ 1 49-57 (1990) 誠文堂新光社）。一般にカルコン類、オーロン類、アントシアニンは植物細胞中では配糖体として液胞中に蓄積する。アントシアニンの生合成経路はよく研究されており、アントシアニンの合成に関与する酵素やそれらをコードする遺伝子が知られている（Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)）。

【0006】

フラボノイドの生合成経路は高等植物には広く存在しており、また、種間で共通している。THCは、3分子のマロニルCoAと1分子のクマロイルCoAからカルコン合成酵素の触媒作用により生合成される。THCは薄い黄色を呈するが、植物においては、通常カルコン異性化酵素（CHI）により速やかに無色のナリングениンに変換される。また、THCは中性付近のpHではきわめて不安定であり、自発的に閉環してナリングениンに変換する。THCが植物細胞中で安定に存在、すなわち黄色を安定に呈するためには、THCの2' 位が糖により修飾さ

れ閉環できなくなることが必要である。この反応はTHCの2' にグルコースを転移する酵素(UDP-グルコース:4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン 2' -糖転移酵素 以下2' CGT)により触媒される。

#### 【0007】

THC2' 配糖体はカーネーション、シクラメンなどに存在することから、2' CGTもこれらの花に存在すると予測される。したがって、2' CGT遺伝子を得る事ができれば、この酵素遺伝子を植物において発現し、THC 2' 配糖体を蓄積させ、黄色の花を作成できると考えられていた(Biotechnology of Ornamental Plants, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997))。また、THC 2' 配糖体を十分蓄積し黄色を発色させるためにはCHI遺伝子が欠損し、THCからナリングニンへの酵素的変換が抑制されること、さらに明瞭な黄色の発色のためにはCHI遺伝子と他にフラバノン3-水酸化酵素(以下、F3Hという)遺伝子も欠損する必要があることが知られていた(Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002))。

#### 【0008】

これまでにカーネーションの2' CGT遺伝子をクローニングしたという報告はある(Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003))がその配列は開示されていない。また、カーネーションから2' CGT活性をコードする遺伝子を取得し、ペチュニアで発現させ、ペチュニア花卉においてTHC 2' 配糖体を蓄積した例もある(PCT/JP03/10500)。しかしながら、2' CGTによって生成するTHC 2' 配糖体は、その化学構造上、オーロン合成の前駆体となることが不可能となる。また、前述のようにTHC2' 配糖体の蓄積では、うすい黄色の花卉にしかならない。

#### 【0009】

THCの2' 位の水酸基がメチル化された化合物が蓄積した場合も花卉は淡い黄色となることは知られているが、このメチル化を触媒する酵素やその遺伝子の実体は知られていない。ダリア、コスモスなどの黄色の品種には6' -デオキシカルコンが含まれる。マメ科植物においては、6' -デオキシカルコンは5-デオキシフラボノイドの前駆体であり、カルコンシンターゼ(CHS)とカルコンリダクターゼ(CHR)の触媒作用により生合成される。ペチュニアにアルファルファのCHR遺伝子を導入したところ、ブテインなどの6' -デオキシカルコン類が生成したことが報告されているが、当該CHR遺伝子を白い花をもつペチュニアに導入した場合、つぼみの段階ではごく薄い黄色が見られたが、開花時にはほとんど白であり、産業上有用な黄色の花を作出するに至らなかった(Plant J. 13, 259 (1998))。

#### 【0010】

前述のようにカルコン配糖体よりもオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈するため、オーロンを蓄積させる方法を開発できれば産業上きわめて有用である。オーロンの生合成に関わる酵素の1つであるASとその遺伝子については既に報告されている(Science, 290, 1163 (2000))。この報告によればASはTHC、ペンタヒドロキシカルコン(PHC)や、これらの配糖体を基質としてAU、ブラクテアチンならびにこれらの配糖体を生成する。しかしながら、AS遺伝子を用いてAUやブラクテアチンなどのオーロンを生物において蓄積させた報告はない。

#### 【0011】

我々はAS遺伝子を構成的プロモーターの制御下に結合したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法によりペチュニアやトレニアにAS遺伝子を導入したが、オーロンの蓄積は認められなかった。一方、アントシアニジンの3位の配糖化がアントシアニンの液胞への移行に必須であると報告されているが(Nature 375, 397 (1995))、これと同様にオーロンの配糖化が液胞への移行シグナルとして必須である可能性が考えられる。実際に黄色キンギョソウ花卉に蓄積している主要なオーロンはAUの6位の配糖化物である。そこで、AUの6位に配糖化活性を示すGT(AU6GT)を取得し(WO 00/49155)、このAU6GT遺伝子とAS遺伝子を共にペチュニアで構成的に発現させたが、オーロンの蓄積は見られなかった。

#### 【0012】



フラボノイドやアントシアニンの生合成に関与する酵素は細胞内では細胞質か小胞体に存在すると考えられている。これらの酵素の働きでフラボノイドやアントシアニンは液胞の外側、すなわち細胞質側で合成され、配糖化された後、液胞に輸送される(Natural Product Reports 20, 288, (2003))。ところが、鋭意検討の結果、ASは例外的に液胞内に存在することを本発明者らは明らかにした。このことから生体内では、配糖化されたカルコンが液胞に輸送され、これを基質として液胞内でオーロンが合成されるのではないかという着想を得た。

#### 【0013】

前述のように黄色キンギョソウ花卉の液胞に蓄積する主要なオーロンはAU 6位配糖化物である。AUの6位はTHCの4' 位に対応し、黄色キンギョソウ花卉にはTHC 4' 配糖体も存在する。これらに基づき、細胞質で合成されたTHCの4' 位が配糖化された後、液胞に輸送され、それを基質としてASによってAU 6位配糖化物が合成されるという一連のオーロン合成経路を推測するにいたった。よってAU 6位配糖化物などのオーロンを異種植物で合成させるためには、THC4' 配糖体を合成することが必須であると考えた。そのためには、THCの4' 位を配糖化するUDP-グルコース：4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン4' 配糖化酵素、以下4' CGT)が必要であり、4' CGT遺伝子を取得する必要がある。しかしながら、4' CGT遺伝子は今までにクローニングされた報告もなく、4' CGTが単離された報告もない。

#### 【0014】

フラボノイドをはじめ多様な化合物の糖転移反応を触媒して配糖体を生成する酵素は、一般に糖転移酵素(GT)と呼ばれ、植物は、基質及び転移する糖の種類に対応した多様な分子種のGTおよびそれらをコードする遺伝子を持っている。GTは通常UDP-グルコースをグルコース供与体として利用するので、そのアミノ酸配列中にUDP-グルコースに結合するモチーフを含んでいる(Plant Physiol. 112, 446 (2001))。このモチーフを有するGT遺伝子は、すでにゲノムの全構造が明らかになっているアラビドプシスには99種あることが知られている(J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。

#### 【0015】

また他の植物からも、いくつかのGTのアミノ酸配列と機能が解明されている。フラボノイドあるいはアントシアニジンの3位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素(UDP-グルコース：フラボノイド3-糖転移酵素、以下3GT)の遺伝子は、シソ、トウモロコシ、リンドウ、ブドウなどから得られている(J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999); J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。また、アントシアニンの5位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素(UDP-グルコース：アントシアニン5-糖転移酵素、以下5GT)の遺伝子は、シソ、バーベナなどから得られている(J. Biol. Chem., 274, 7405, (1999))。

#### 【0016】

3GTや5GTのアミノ酸配列の解析から、同一機能を有するGTは植物種が異なってもアミノ酸配列は類似していること、すなわちファミリーを形成することが知られている(J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。よって、既知のGTと同一機能を有する酵素(オルソログ)を他の植物種から得る事は、現在の技術水準からすれば困難ではない。たとえば、ペチュニアの5GT遺伝子は、シソの5GT遺伝子を用いてクローニングされた(Plant Mol Biol. 48, 401 (2002).)。しかしながら、同一の機能を有する酵素が全く得られていない新規GT遺伝子の取得には多大の試行錯誤と困難が伴う。

#### 【0017】

前述のように全ゲノム構造が明らかになっているアラビドプシスであるが、その花卉は白く、カルコン4' 配糖体の蓄積は報告されていない。したがって、アラビドプシスのGT遺伝子の情報を利用して4' CGT遺伝子のクローニングを行うことはできない。また、カーネーションから2' CGTが単離(PCT/JP03/10500)されているが、4' CGT遺伝子と2' CGTの相同性が高いことは必ずしも期待できない。なぜならば、基質が共通であっても糖を付加する位置が異なれば、それぞれのGTの生化学的および分子生物学的特性は大きく異なる可能性が考えられるからである。これは、3GTと5GTが別のGTファミリーに属することによっ

でも支持される。また、ベタニジンの5GTと6GTは基質が共通にも関わらず、アミノ酸同一性は19%しかないことが報告されている (Planta 214, 492 (2002))。

#### 【0018】

事実、共通のアントシアニン骨格の3位、5位または3' 位に糖を転移する各GTは、GTスーパーファミリーの中の異なるファミリーに属し、これらのファミリー間のアミノ酸同一性は20%程度に過ぎない (Plant Physiol. 132, 1652, (2003), Natural Product Reports 20, 288, (2003))。4' CGT 遺伝子のみならず、新規の遺伝子を取得するには一般にいくつかの方法が考えられる。たとえば花卉で発現しているバラの香り成分の合成に関与する酵素の遺伝子は、遺伝子を網羅的に配列決定し、それらの構造、発現様式、大腸菌での発現によって同定された (Plant Cell. 14, 2325 (2002))。そこで4' CGT 遺伝子と同定するためにオーロンおよびカルコン4' 配糖体を蓄積する黄色キンギョソウ (品種バタフライイエロー) 花卉由来のcDNAライブラリーからランダムに5000クローンを選び、これらの塩基配列を決定した。

#### 【0019】

公知のDNAデータベースを用いたホモロジー検索の結果、3種のGT遺伝子が得られた。そのうち2種は3GT遺伝子および前述の、AU6GTをコードする遺伝子 (WO 00/49155)、残る1種が新規GT (pSPB662と命名) であった (配列番号: 13)。しかし、pSPB662にコードされるGTはTHCに対する配糖化活性を示さず、THC4' GTではないことが明らかとなった。また、前述のように同遺伝子とオーロン合成酵素遺伝子とを共にペチュニアにおいて高発現させた結果、カルコン配糖体およびオーロンの生成は確認されず、花色についても変化は認められなかった。これらの結果から、5000クローン程度のランダムスクリーニングによってはカルコン配糖化酵素遺伝子を単離できないことが示唆され、4' CGT 遺伝子を取得するのは、困難であった。

#### 【0020】

【特許文献1】PCT/JP03/10500

【特許文献2】WO 00/49155

#### 【0021】

【非特許文献1】Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)

【非特許文献2】Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001)

【非特許文献3】Phytochemistry 5,111 (1996)

【非特許文献4】バイオホルテイ 1 49-57 (1990) 誠文堂新光社

【非特許文献5】Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)

【非特許文献6】Biotechnology of Ornamental Plants, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)

【非特許文献7】Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002)

【非特許文献8】Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003)

【非特許文献9】Plant J. 13, 259 (1998)

#### 【0022】

【非特許文献10】Science, 290, 1163 (2000)

【非特許文献11】Nature 375, 397 (1995)

【非特許文献12】Natural Product Reports 20, 288, (2003)

【非特許文献13】Plant Physiol. 112, 446 (2001)

【非特許文献14】J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001)

【非特許文献15】J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999)

【非特許文献16】Plant Mol Biol. 48, 401 (2002)

【非特許文献17】Planta 214, 492 (2002)

【非特許文献18】Plant Physiol. 132, 1652, 2003 (2003)

【非特許文献19】Plant Cell. 14, 2325 (2002)

【発明の開示】

**【発明が解決しようとする課題】****【0023】**

本発明は、カルコン類の4' 位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の4' 位の水酸基に特異的に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子を提供することにある。さらに当該GT遺伝子を用いて花色を改変、好ましくは黄色に変化させた植物体を提供することにある。

**【課題を解決するための手段】****【0024】**

前述のように、4' CGTの生化学的あるいは分子生物学的な性質は知られておらず、酵素が精製されたり、その遺伝子がクローニングされたこともなかった。発明者らは、黄色キンギョソウ（バタフライイエロー）の花弁cDNAライブラリーからGTファミリーの保存アミノ酸配列に対応した塩基配列を有するプローブを用いて、当該保存アミノ酸配列の塩基配列を有するGT遺伝子を数十種類取得した。さらに、当該GT遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸菌の抽出液中にカルコンの4' 位にグルコースを転移する活性、すなわち4' CGT活性を確認し、クローン化した遺伝子が4' CGTをコードすることを確認した。この遺伝子を植物中で発現させ、花色を改変し、本発明を完成した。

**【0025】**

すなわち、本発明は、（1）カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はまた、（2）配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する前記（1）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（3）配列番号1に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5 x SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする前記（1）記載の遺伝子を提供する。

**【0026】**

本発明はまた、（4）配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（1）に記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（5）配列番号1に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（1）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（6）ゴマノハグサ科由来である前記（1）～（5）のいずれか1項に記載の遺伝子を提供する。

**【0027】**

本発明はまた、（7）前記（1）～（6）のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、（8）前記（7）に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、（9）前記（1）～（6）のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質を提供する。

本発明はまた、（10）前記（7）に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法を提供する。

本発明はまた、（11）前記（1）～（6）のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織を提供する。

**【0028】**

本発明はまた、（12）前記（11）に記載の植物体の切り花を提供する。

本発明はまた、（13）前記（1）～（6）のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてカル

コン類の4' 位に糖を転移する方法を提供する。

本発明はまた、(14) 前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体を提供する。

本発明はまた、(15) 花色が黄色味を帯びていることを特徴とする前記 (14) に記載の植物体を提供する。

#### 【0029】

本発明はまた、(16) 前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(17) 前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(18) 前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(19) 前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン 3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0030】

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号 2 に記載したアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同等の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、4' CGT 活性を保持しているタンパク質である限り、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して 1 個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子も本発明に属する。なお、複数個とは、2 ~ 30 個、好ましくは 2 ~ 9 個をいう。

##### 【0031】

本発明はまた、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA に対し、5xSSC、50℃といった比較的温和な条件下でハイブリダイズし、かつ 4' CGT 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。さらに、配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA に対しストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ 4' CGT 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も、本発明の技術的範囲に属する。ここでいうストリンジントな条件とは、例えば 2 x SSC、65℃があるが、ハイブリダイゼーションの条件はプローブに用いる DNA の長さ及び塩基組成によって異なるから、この条件に限定されない。

##### 【0032】

上述のようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、好ましくはゴマノハグ科由来のもの、さらに好ましくはキンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の遺伝子が挙げられるが、植物由来に限定されるものではない。すなわち、本発明の 4' CGT 遺伝子は、キンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の 4' CGT 遺伝子に限定されるものではなく、カルコン類 4' 位配糖体を含む他の生物種に由来する 4' CGT 遺伝子であれば、いずれでも黄色の花を育種するのに用いることができる。

また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子は cDNA であってもよく、ゲノム DNA であってもよい。

##### 【0033】

GTの保存領域の相同性を有する遺伝子は実施例に示すように、例えばキンギョソウやリナリア花卉から作製したcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有するGTをコードするDNAは、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAを用いて、公知の部位特定変異誘発法やPCR法を用いて合成することができる。例えばアミノ酸配列を改変したいDNA断片をcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望のアミノ酸配列の改変に対応したプライマーを用い、部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望のアミノ酸配列の改変に対応したDNA断片を得ることができる。その後、この改変を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

#### 【0034】

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分のアミノ酸配列に対応するDNA断片を合成し、連結すればよい。

#### 【0035】

このようにして得られたGT遺伝子を大腸菌又は酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、当該大腸菌又は酵母の抽出液中の4' CGTの活性を測定することにより、得られたGT遺伝子が4' CGTを示すタンパク質をコードすることを確認することができる。4' CGTの活性は、例えば実施例3に記載したように、逆相樹脂に4' CGTの基質となるカルコン類を吸着させ後、当該逆相樹脂をGT遺伝子で形質転換した大腸菌又は酵母の抽出液と反応させ、生成したカルコン4' 配糖体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析することにより測定できる。

#### 【0036】

さらに、得られた4' CGT遺伝子を適切な宿主細胞で発現させることにより、当該遺伝子の産物である4' CGTタンパク質を得ることができる。あるいはまた、配列番号2に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を有するタンパク質又はペプチドに対する抗体を用いて他の生物の4' CGT遺伝子を発現クローニングによって得ることもできる。

#### 【0037】

本発明はまた、4' CGT遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバチルス・スブチルス (*Bacillus subtilis*) など従来公知の宿主細胞を用いることができる。

#### 【0038】

真核細胞としては、例えば真核微生物、好ましくは酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母が挙げられ、また糸状菌としては、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等のアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、及びペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物等が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞も宿主細胞として使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

#### 【0039】

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の生物種に依存したプロモーターおよびターミネーター等の発現制御領域、及び複製起点等を含有する。細菌用、特に大腸菌における発現ベクターのプロモーターとしては、従来公知のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用できる。また、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プ

ロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等のプロモーターが使用できるが、これらのプロモーターに限定されるものではない。また動物細胞用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も従来公知の方法に従って行うことができる。

#### 【0040】

植物の発現ベクターの構築は、例えばアグロバクテリウムを用いる場合にはpBI121などのバイナリーベクターを、パーティクルガンを用いる場合にはpUC19などの大腸菌ベクターを用いることができる。さらに、当該植物の発現ベクターで形質転換された植物細胞を例えば抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子を用いて選抜し、適切な植物ホルモン等の条件を用いて再分化させ、4' CGT遺伝子で形質転換された植物体を得ることができる。当該形質転換植物を栽培することにより、開花させ、花色が改変された植物体を得ることができる。

#### 【0041】

発現ベクターによって形質転換された宿主細胞又は形質転換植物体を培養又は栽培し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする4' CGTタンパク質を回収、精製することができる。

#### 【0042】

本発明はキンギョソウやリナリアの4' CGT遺伝子のみに限定されるものではなく、4' CGTの起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、4' CGT活性を有していれば同様に花色改変へ利用できる。本発明はまた、4' CGT遺伝子の利用に関するものであり、4' CGT遺伝子を植物体に導入・発現することにより、花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体又はこれら植物体の組織も本発明の技術的範囲であり、組織の形態としては切り花であってもよい。また4' CGT遺伝子のみでなく、4' CGTに加えAS遺伝子も共に植物体へ導入、発現させたり、さらに加えて、宿主が本来有するフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体またはこれら植物体の組織も本発明の技術範囲であり組織の形態としては切り花であってもよい。

#### 【0043】

現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法、コサプレッション法、RNA法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、レンギョウ、ベゴニア、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0044】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、W096/25500あるいはMolecular Cloning(Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

#### 実施例 1. 黄色キンギョソウ花卉cDNA ライブラリーの構築

黄色のキンギョソウである品種バタフライイエローの新鮮な花卉5gから論文(Science 290, 1163 (2000))に記載のようにしてcDNAライブラリーを構築した。得られたライブラリーは、 $1.6 \times 10^5$  plaque forming unitからなっていた。

#### 【0045】

#### 実施例 2. 4' CGT遺伝子のスクリーニング 1

すでに開示されているGTのアミノ酸配列を比較し、これらのアミノ酸配列の保存領域に相当する塩基配列を増幅し、これをプローブとして実施例1で述べたキンギョソウcDNAライブラリーをスクリーニングした。

プローブに用いたGTはアサガオ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3-グルコシド糖転移酵素 (3GGT) (特開2003-289884)、ペチュニア由来3GT (Plant Mol. Biol. 48, 401, (2002))、バーベナ由来5GT (J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999))、コガネバナGT (SBGT, Planta 210, 1006 (2000))、リンドウ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3'-糖転移酵素 (3' GT) (Plant Physiol. 132, 1652, (2003))配列の5種である。それぞれGTについて、保存された領域の配列を増幅できるように1組のオリゴヌクレオチドを合成した。これらオリゴヌクレオチドの配列を配列番号：3～12に示す。

#### 【0046】

アサガオ3GGT

配列番号3 : 5' -GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3'

配列番号4 : 5' -ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3'

ペチュニア3GT

配列番号5 : 5' -GAT GCA TAA TTT GGC TAG AAA AGC-3'

配列番号6 : 5' -CCA ATT TGC CAA ACA CTT TCC-3'

#### 【0047】

バーベナ5GT

配列番号7 : 5' -TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3'

配列番号8 : 5' -CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3'

コガネバナGT

配列番号9 : 5' -CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3'

配列番号10 : 5' -CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3'

リンドウ3' GT

配列番号11 : 5' -TGT CTG AAT TGG CTT GAT TCC-3'

配列番号12 : 5' -AAC CCA CAG AAA CCC CTG TTC-3'

#### 【0048】

プローブはノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて、製造者が推奨する条件に従いPCRによりラベルした。この際、鋳型として1ngのそれぞれのcDNAを含むプラスミドを用い、プライマーとして、上記の各遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド100ngを使用し、95℃1分、55℃1分、72℃2分からなる反応を1サイクルとし、これを25サイクル行った。各遺伝子のPCR増幅産物を等量混合したものをハイブリダイゼーションのプローブとして、実施例1に記載のキンギョソウ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。

#### 【0049】

ハイブリダイゼーションは、30%ホルムアミド、1%SDSを含む5XSSC中、37℃で一晩行い、フィルターの洗浄は5x SSC, 1%SDSを用いて55℃で30分間行った。スクリーニングによるポジティブシグナルの検出はノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用い、製造者の推奨する方法に従った。約30万プラークをスクリーニングし、最終的に10種類の完全長糖酵素転移酵素遺伝子を含むクローンを得た (pSPB264, 1621, 1620, 1622, 1610, 1609, 1617, 1615, 660, 658)。DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によってこれらのcDNA配列を決定した。これらcDNAのアミノ酸コード領域の塩基配列を配列番号14～23に示した。

#### 【0050】

##### 実施例3. 大腸菌を用いたカルコンGT活性の測定

##### 3-1 大腸菌発現ベクターの構築と大腸菌におけるGTの発現

実施例2で得られた10種類のcDNAにコードされるGT活性を大腸菌発現系を用いて解析した。まず、各cDNAの大腸菌発現コンストラクトを作製した。PCR法によって各cDNAの暫定



的開始メチオニンコドンに重なる様にNcoIサイトを導入し、開始メチオニンから終止コドンに至る領域を大腸菌発現ベクターpQE61(QIAGEN)の NcoIおよびKpnI、またはNcoIおよびEcoRVサイトに連結した。

#### 【0051】

開始メチオニンに重なるNcoIサイト導入のためのPCR反応液(25 $\mu$ l)は、各GTc DNAを鋳型とし、開始メチオニン部位に重なるNcoI認識配列を導入したプライマー、及びストップコドン付近の下流から上流に向けてのプライマー各0.2 pmol/ $\mu$ l, 1x ExTaq buffer (Takara), 0.2mM dNTPs, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる。反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で5分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅されたDNA断片のDNA配列を解析し、PCR反応によるエラーがないことを確認したのち、大腸菌発現ベクター p QE61(QIAGEN)に導入した。

#### 【0052】

例えば p SPB1617にコードされるcDNA (配列番号:20) については、配列表に示した1617BamHINcoI-FW (配列番号:24) ならびに1617XhoIKpnI-RV (配列番号:25) の二種のプライマーを用いてPCRを行い、開始メチオニン部位に重なるNcoIサイトと、終始コドン後にKpnIサイトを導入した。増幅されたDNA断片をpCR2.1 TOPO vectorにサブクローニングした。塩基配列にPCRによるエラーがないことを確認後、NcoIとKpnIで切り出したDNA断片を p QEのNcoIおよびKpnIサイトに連結し、p SPB1617cDNAの大腸菌発現ベクターであるpSPB1642を得た。同様にして10種類のGT cDNAの大腸菌発現ベクターを構築した。

#### 【0053】

1617BamHINcoI-FW

配列番号24: 5' -ggg gga tcc atg gct agt gag agc caa ata-3'

1617XhoIKpnI-RW

配列番号25: 5' -ccc ctc gag ggt acc tca caa aac att att cac gac-3'

各発現ベクターを大腸菌株 JM109 (TOYOBO)に導入し、37℃で終濃度20 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むLB培地で一晩前培養した。前培養液の1mlをアンプシリン50 $\mu$ g/ml, カザミノ酸0.5%を含むM9培地、50mlに加えA600=0.6-1.0に達するまで培養した後、IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を終濃度0.1mMになるよう加え、さらに27℃で一晩振とう培養し、3000rpm,10分間、4で遠心し、集菌した。菌体を10mlの緩衝液(30mM Tris-HCl pH7.5、30mM NaCl)に懸濁し、SONIFIER 250 (BRANSON社)での超音波処理により大腸菌を破碎した後、15,000rpm, 10分、4℃で遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

#### 【0054】

##### 3-2 酵素活性の測定

蒸留水で平衡化済みの逆相樹脂、TOYOPEARL HW-40F(TOSOH) 1mlにTHC (500 $\mu$ g/mlエタノール溶液)を蒸留水で希釈しながら負荷した後、水洗することにより、樹脂に固定された基質THCを得た。この樹脂固定されたTHC 100 $\mu$ lに3-1で得られた粗酵素液200 $\mu$ lおよび5mM UDP-glucose 10 $\mu$ lを加え、30℃で1時間反応させた。遠心して上清を除去後、沈殿した樹脂を水洗し、0.1% TFA (Trifluoroacetic acid)を含む50%アセトニトリル300 $\mu$ lに懸濁し、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4℃で遠心分離し、得られた上清をフィルター (ポアサイズ0.45 $\mu$ m、4 mm Millex-LH、ミリポア)を用いて不溶物を除去して、上清を液体高速クロマトグラフィー(以下HPLC)で分析した。カルコンおよびその配糖体の分析条件は以下の通りである。

#### 【0055】

カラムはDevelosil C-30-UG-5(4.5mm $\phi$  x150mm、野村化学)を用いて、移動相にはA液として0.1%TFAを含むH<sub>2</sub>O、B液として0.1%TFAを含む90%アセトニトリルを用い、B液20%からB液70%の直線濃度勾配10分間の溶出後、B液70%で5分間維持した。流速は0.6ml/min、検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A (島津製作所)による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、THCは保持時間10.7分に溶出され、その2' 配



糖体および4' 配糖体は8.5分に溶出されることをTHC及びTHCの2' および4' 配糖体の標品を用いて確認した。

#### 【0056】

pSPB1642を発現する大腸菌の抽出液を反応させたところ、基質THCに加え、8.5分に溶出される新たな生成物が検出された。これらはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液およびpSPB1642を発現する大腸菌の粗酵素液を煮沸した溶液を反応させたものでは検出されなかったことからpSPB1642から発現されるGTによって生じた生成物と考えられる。さらに<sup>1</sup>H NMR分析によって本生成物の構造を調べた。分析にはJNM-EX400 (JEOL) を使い、その他の分析条件は論文 (Plant Physiology 132, 1652 (2003)) に記載のとおりである。この結果、pSPB1642の発現産物によって生じたTHC配糖化物はTHC 2' 配糖体であることが明らかとなった。よって、pSPB1642によって発現されるcDNA、つまりpSPB1617 cDNAは2' CGT活性を有するタンパク質をコードしていると考えられた。

#### 【0057】

##### 実施例 4. 4' CGT遺伝子のスクリーニング 2

黄色キンギョソウ花卉のcDNAライブラリー約30万クローンをpSPB1617 cDNA全長をプローブとして再度スクリーニングした。PCRによるプローブラベリングには、1617-F (配列番号: 26) ならびに1617-R (配列番号: 27) プライマーを用い、実施例 2 記載の方法と同様に行った。スクリーニングと塩基配列の解析方法も実施例 2 と同様である。

#### 【0058】

1617-F

配列番号26 : 5' -ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA ACA-3'

1617-R

配列番号27 : 5' -TAA AAT TTG GTA GTT AAA CCG ATG TA-3'

その結果、新規GT遺伝子を5種、pSPB1721、1724、1723、1719、1725を得た。それぞれの配列を配列表に示した (配列番号: 28~31及び1)。

#### 【0059】

このうちpSPB1725 cDNAは、457アミノ酸からなる分子量50.8kDa、pI6.82のタンパク質をコードする1374bp (ストップコドンを除く) のORFを含んでいた。pSPB1725 cDNAがコードするアミノ酸配列 (配列番号: 2) を、すでに報告のあるGTのアミノ酸配列と比較したところリビングストーンデージー由来GT (Plant J. 19, 509 (1999)) と14%、シソ由来5GTと18%、シソ由来3GTと18%、リンドウの3' GTと23%、プローブとして用いたpSPB1617にコードされるタンパク質のアミノ酸配列とは31%の同一性しか示さなかった。なお、ホモロジー解析に使用したソフトウェアはMacVector ver.6.5.3 (Oxford Molecular) に含まれるClustalWで、条件は、Matrix Blosom 30、ketuple:1、Gap penalty:3、Topdiagonals :5、Windows Size:5で行った。

#### 【0060】

##### 実施例 5. 得られたcDNAの大腸菌における発現

##### 5-1. 発現ベクターの構築

実施例 4 で得られた5種類のcDNAについて、大腸菌発現系を用い各cDNAにコードされるタンパク質の酵素活性の測定を調べた。発現ベクターの構築ならびに発現方法、活性測定方法は実施例 3 と同様である。例えばpSPB1725については、開始コドンの5' 側にNcoI 認識配列を導入するために、以下に示すプライマー2種1725-NcoI (配列番号: 32)、1725-KpnI (配列番号: 33) を用いてPCR反応を行った。

#### 【0061】

1725-NcoI

配列番号32 : 5' -CCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA-3'

1725-KpnI

配列番号33 : 5' -GGT ACC TAT AAA ATT TGG TAG TTA AA-3'

PCR反応液 (25 $\mu$ l) は、pSP1725 DNA 10ng, 1x ExTaq buffer (Takara), 0.2mM dNTPs, 1725-NcoI、1725-KpnIプライマー各0.2 pmol/ $\mu$ l, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる

。

## 【0062】

反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅産物の塩基配列を確認したのち、NcoIおよびKpnI処理によってpCR2.1 TOPO vectorから切り出される約1.4Kbのフラグメントを pQE61 (QIAGEN) のNcoIとKpnIサイトに連結し、大腸菌発現ベクター pSPB1768を得た。これを大腸菌 JM109 株(TOYOBO)に導入した。他の4種類の cDNAについても同様にしてそれぞれpQE61を用いた大腸菌発現ベクターを構築し、JM109に導入した。

## 【0063】

5-2組換えタンパク質の大腸菌における発現と活性測定GT活性の測定

実施例5-1で得られた大腸菌形質転換株を、実施例3と同様の条件で培養し、それぞれのcDNAにコードされるタンパク質の活性測定を行った。その結果、pSPB1768を含む大腸菌の粗酵素液とTHCの反応物中に、THC配糖化物と思われるピークを検出した。このTHC配糖化物をさらに詳しく同定するために、以下に記載のTHC2' 配糖体とTHC4' 配糖体を分離する条件にて再度HPLC分析を行った。

## 【0064】

カラムはYMC-ODS-A312(6mm  $\phi$  x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH<sub>2</sub>O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配15分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配10分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/min.で行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A (島津製作所) による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。

## 【0065】

この条件で、THCは保持時間26.7分に溶出され、THC2' 配糖体は19.8分、THC 4' 配糖体は20.6分に溶出される。pSPB1768を発現する大腸菌抽出液とTHCの反応液に見出されたTHC配糖化物は本条件による分析で20.6分に溶出されたのでTHC 4' 配糖体であると考えられた。これはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことから pSPB1725にコードされるGTによって生じた産物と考えられる。以上の結果から、pSPB1725 cDNAにコードされるGTはTHCの4' 位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

## 【0066】

また、本反応液中にはTHC4' 配糖体に加えて15.5分に溶出される新たなピークが検出された。この物質はナリンゲニンの吸収スペクトルを示し、ナリンゲニン7位配糖体標品と保持時間が一致した。よってこの15.5分に溶出された生成物はpSPB1725にコードされる4' CGTによって生成したTHC 4' 配糖化物が、配糖化後に閉環して生じたナリンゲニン7位配糖体あるいはTHCが閉環して生じたナリンゲニンに、4' CGTが作用して生じたナリンゲニン7位配糖体と考えられる。

## 【0067】

実施例6. キンギョソウ花卉における4' CGT遺伝子の発現解析

RT-PCR法によってpSPB1725にコードされる4' CGT遺伝子の黄色キンギョソウ花卉における発現様式を解析した。オーロンを蓄積する黄色キンギョソウ (バタフライイエロー品種) の花卉を成長段階に沿って5ステージに分離した。若い順に、ステージ1(蕾花卉長1cm以下)、2(蕾か弁長1.0-1.5cm)、3(蕾花卉長1.5-2.0cm)、4(花卉長2.0-2.5cm、開花直前) および5(花卉長2.5cm以上、開花後の花卉)の5段階とし、ステージ5は成熟した花卉に対応する。

## 【0068】

分離した花卉から1g からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。得られたRNA 1 $\mu$ gを鋳型として逆転写反応を行い、cDNAを得た。cDNA合成にはSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(GIBCO BRL)を利用し、合成条件は本シス

テム製造業者が推奨する条件に従った。得られたステージ別の cDNA を鋳型に、実施例 5 に記載の 1725-NcoI (配列番号: 32) および 1725-KpnI プライマー (配列番号: 33) を用いて PCR 反応を行った。また、4' CGT 遺伝子発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、内部標準遺伝子としてキンギョソウのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子 (配列番号: 34) を用い (Nature 339, 46 (1989))、本遺伝子増幅のために AmGAPDH-F (配列番号: 35)、AmGAPDH-R (配列番号: 36) のプライマーを合成した。また、比較対象遺伝子としてキンギョソウの AS 遺伝子増幅のために AmAS-F (配列番号: 37)、AmAS-R プライマー (配列番号: 38) を合成した。

#### 【0069】

AmGAPDH-F

配列番号 35: 5' -tgt tgc tgt taa cga tcc at-3'

AmGAPDH-R

配列番号 36: 5' -agc tct tcc acc tct cca-3'

AmAS-F

配列番号 37: 5' -atg ttc aaa aat cct aat atc cgc-3'

AmAS-R

配列番号 38: 5' -tta gcc atc aag ctc aat ctt gac a-3'

#### 【0070】

PCR 反応条件は実施例 3 と同様の反応組成で、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分を 12 サイクル行った。PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動で分離した後、常法によって Hybond-N ナイロンメンブレン (アマシャム) にブロッティングし、ハイブリダイゼーションによる増幅産物の検出を行った。ハイブリダイゼーション方法については前述のノンラジオアイソトープ DIG-核酸検出システム DIG DNA 標識及び検出キットを用い、製造者の推奨する方法に従った。プローブには、キンギョソウの AS、GAPDH および pSPB1725 にコードされる 4' CGT の cDNA を用い、実施例 2 同様にして、上記の各遺伝子特異的プライマー (配列番号 32, 33, 35~38) を用いて DIG ラベリングを行った。

#### 【0071】

その結果、4' CGT 遺伝子及び AS 遺伝子はともにステージ 4 で発現がピークに達し、経時的に同様の発現パターンを示すことが分かった。さらに両遺伝子の発現パターンは黄色キンギョソウ花卉に含まれるカルコン 4' 配糖体およびオーロンの蓄積パターンに矛盾しないと考えられた (Plant Sci. 160, 229 (2001))。

以上の結果から pSPB1725 にコードされる 4' CGT 遺伝子は、キンギョソウ花卉内においてオーロン合成酵素遺伝子と同一の発現制御支配下に存在することが考えられ、両者は同一の生合成経路、すなわちオーロン生合成経路に関わっていると考えられる。

#### 【0072】

##### 実施例 7 植物における 4' CGT と AS の共発現

##### 7-1 4' CGT 発現カセットの構築

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37, 45 (1996)) を SnaBI で消化し、再連結することにより omega 配列を除き、得られたプラスミドを pUE6 とした。一方、pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) を AscI で消化し、平滑末端化後、PacI リンカーを挿入したプラスミドを pUCPP とした。pUE6 の E1235S プロモーターから NOS ターミネーターまでを有する断片を、pUCPP の HindIII と EcoRI サイトに挿入し pSPB540 を得た。pSPB540 の GUS 遺伝子部分を pSPB1725 から切り出される 4' CGT cDNA 断片に置換し得られたプラスミドを pSFL203 とした。すなわち、pSFL203 は pUCPP をベクターとし、E1235S プロモーターと NOS ターミネーターで制御される 4' CGT 発現カセットを有するものである。

#### 【0073】

##### 7-2 AS 発現カセットの構築

キンギョソウ由来の AS cDNA (Science 290, 1163, (2000)) が pBluescript II SK-ベクター (Stratagene) の EcoRI と XhoI サイトに挿入したプラスミドを pSPB251 とした。pBINPLUS (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) に MacI プロモータ

一、pSPB251から切り出したAS cDNA断片、MASターミネーターを連結したAS発現コンストラクトをpSPB1624とした。

#### 【0074】

##### 7-3 4' CGTとASの共発現コンストラクトの作製

7-1に記載のpSFL203をPacIで切断し、カルコン配糖化酵素遺伝子発現カセットを切り出し、これを7-2記載のpSPB1624のPacIサイトに挿入した。得られたコンストラクトをpSFL201とした。よってpSFL201は植物細胞に導入された場合、4' CGT遺伝子とAS遺伝子が構成的に発現するように設計されている。

#### 【0075】

##### 実施例8 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制

##### 8-1トレニア由来のDFR遺伝子発現抑制カセットの構築

トレニアのジヒドロフラボノール還元酵素 (DFR) cDNAについては論文(Plant Science 153, 33, 2000)に記載のようにして取得した。トレニアDFR cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpTDF10とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー (配列番号39) とトレニアDFR cDNA配列に塩基置換でNcoI認識部位を導入したプライマーThDFR-NcoI (配列番号40) を用いて、実施例3に記載のようにしてPCRを行った。得られた約0.75kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO (インビトロジェン) にクローニングし、塩基配列を確認したのち、SacIとNcoIで0.75kbのトレニアDFR cDNA配列を切り出した。

#### 【0076】

またpTDF10をBamHIとNcoIで切断し、トレニアDFR cDNAの5' 末端から1.1kbを含むフラグメントを回収した。一方、7-1記載のpUCAPをPacIで消化し、平滑末端化後、AscIリンカーを挿入したプラスミドをpUCAAとした。このpUCAAのHindIIIとEcoRIサイトに、pUE6から切り出したEl<sub>2</sub>35Sプロモーター～GUS～NOSターミネーターに至るフラグメントを挿入し、得られたプラスミドをpSPB541とした。pSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここに、トレニアDFR cDNA由来の0.75kbのフラグメントとおよび1.1kbのフラグメントを、両フラグメントのNcoI部位が連結する方向に挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL314は、植物体内の導入された場合、El<sub>2</sub>35Sプロモーターの制御下、トレニアのDFR cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのDFR遺伝子発現を抑制することができるものである。

#### 【0077】

M13リバースプライマー

配列番号39: 5' -AACAGCTATGACCATG-3'

ThDFR-NcoI

配列番号40: 5' -GCTTTACCATGGAGTAATGAGCTT-3'

#### 【0078】

##### 8-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制のためのコンストラクトの構築

7-1記載のpUE6のNOSターミネーター上流にXhoIリンカーを挿入した。このプラスミドをBamHIとXhoIで消化して得られるEl<sub>2</sub>35Sプロモーター～ベクター～NOSターミネーターからなる断片と7-2記載のpSPB215からBamHIとXhoIで切り出したAS cDNA断片を連結しpSPB211を得た。pSPB211からHindIIIとEcoRIでAS発現カセットを切り出し、これをpBINPLUSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入した。このようにして得られたプラスミドのPacIサイトに、7-1記載のpSFL203をPacI切断して得られる4' CGT発現カセットを挿入し、4' CGTとASの発現カセットがタンデムに連結したpSFL304を得た。さらに8-1記載のトレニアDFR 二本鎖RNA転写カセットをpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL307を得た。つまりpSFL307は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのDFR抑制のための3つのカセットを有する。

#### 【0079】

##### 実施例9 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制

##### 9-1トレニア由来のF3H cDNAのクローニングと同遺伝子発現抑制カセットの構築

シンソから得られたF3H cDNA (Plant Mol Biol., 35, 915 (1997)) をプローブとして、

トレニアの同酵素をコードするcDNAを取得した。すなわち、実施例2同様にして、トレニアcDNAライブラリー (Molecular Breeding, 6, 239, 2000) 約20万のファージをスクリーニングした結果、配列番号41に示すトレニアF3H cDNAを得た。トレニアF3H cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpSPB266とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバープライマー (配列番号39) とトレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-1 (配列番号42) を用いて、実施例3同様にしてPCRを行った。

#### 【0080】

得られた約0.9kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO (インビトロジェン) にクローニングし、塩基配列を確認した。同様にして、トレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-2 (配列番号43) とM13リバープライマーを用いて、約0.75kbのDNA断片を調整し、pCR2.1-TOPOにクローニングし、塩基配列を確認した。実施例8-1に記載のpSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここにpCR2.1-TOPOからBamHIとSalI切断で切り出した0.9kbのフラグメントと、pCR2.1-TOPOからSacIとSalI切断で切り出した0.7kbのフラグメントを両フラグメントのSalI部位が連結するように挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL313は、植物体内に導入された場合、E1<sub>2</sub>35 Sプロモーターの制御下、トレニアのF3H cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのF3H遺伝子発現を抑制するものである。

#### 【0081】

ThF3H-SalI-1

配列番号42: 5' -ttctctgtcgcagccattgcc-3'

ThF3H-SalI-2

配列番号43: 5' -cgccgtgtcgactcgcttgaag-3'

#### 【0082】

9-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制のためのコンストラクトの構築  
9-1記載のpSFL313からAscI切断によりトレニアF3H RNAi抑制カセットを切り出し、実施例8-2記載のpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL308を得た。つまりpSFL308は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのF3H抑制のための3つのカセットを有する。

#### 【0083】

##### 実施例10. 植物における遺伝子発現と花色分析

実施例7-9で述べたpSFL201、pSFL307およびpSFL308を公知の方法でトレニア (品種サマーウェーブブルー (サントリーフラワーズ株式会社)) に導入した。形質転換の方法はMol. Breeding, 6, 239, (2000)に記載の方法にしたがった。選択マーカー耐性を示した個体を選抜し、それぞれの花色を観察した。pSFL201導入株では、得られた35系統の形質転換体のうち、22系統において宿主と比べて花色変化が見られ、黄色味を帯びた青、もしくは黄色味を帯びたグレーを示した。

#### 【0084】

しかし、完全に黄色になったものはなかった。pSFL307導入株では得られた36系統の形質転換体のうち、19系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した19系統のうち6系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。またpSFL308導入株では得られた39系統の形質転換体のうち、24系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した24系統のうち17系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。

#### 【0085】

花色変化が比較的顕著であったものについて色素分析を行った。

元株および各形質転換体の花卉を0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む50%アセトニトリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりオーレオシジン6位配糖化物およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニン分析については花卉より抽出したフラボノイドを6NHClにて沸騰水中、20分間で加水分解後、アミルアルコールにてフラボノイドを再抽出したものを分析に供した。HPLC条件はそれぞれ

れ以下のとおりである。

#### 【0086】

まずAU6位配糖化物の検出には、SHIM-PACK FC-ODSカラム(50×4.6mm、島津製作所)を用い、移動相にはA液として0.05%TFAを含むH<sub>2</sub>O、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/minで行った。検出は360、400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による250-500nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、THC 4' 位配糖化物、AU 6位配糖化物標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。

#### 【0087】

次にアントシアニジンはカラムはYMC-ODS-A A312(6×150mm、株式会社ワイエムシー)を用いた。移動相には酢酸、メタノール、蒸留水をそれぞれ60:70:270に混合したものを、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による400-600nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

#### 【0088】

その結果、p SFL201を導入した形質転換体ではTHC 4' 位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、それぞれ花卉中に0.02%および0.05%(花卉新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。また宿主が本来含有するアントシアニン類も形質転換体中存在するため、これら形質転換体で観察された黄色がかった青またはグレーの花色は、THC 4' 位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物と、マルビジンなどのアントシアニン類が共存したためと考えられる。

#### 【0089】

一方、p SFL307および308を導入した形質転換体ではオーロンの一種であるAU6位配糖化物のみと保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、ともに花卉中に0.09%(花卉新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。またpSFL201を導入した系統とは異なり、p SFL307またはp SFL308が導入された系統では、宿主が本来有するアントシアニン類が宿主花卉に含まれる当該アントシアニジンの10~50%と著しく減少していることが確認された。

#### 【0090】

実施例11. ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによる4' CGT遺伝子導入の確認

実施例10で得られた形質転換体のうち、花卉の色素分析結果からTHC 4' 位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物の蓄積量が比較的多かった系統を、各コンストラクト導入株から3系統ずつ選抜し、ゲノミックハイブリダイゼーションをおこなった。形質転換体の葉、約1gからPhytopure Plant DNA Extraction kit(Amersham)を用い、製造業者推奨の方法によってゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNA各20μgを制限酵素KpnIで切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動にて分離後、常法にしたがってHybond-N<sup>+</sup> ナイロンメンブレンに転写後、ノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムを用い、ハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0091】

4' CGTプローブのDIGラベリング、ハイブリダイゼーションならびに検出方法は実施例6同様に製造業者推奨の方法に従った。ハイブリダイゼーションの結果を図2に示す。p SFL201、p SFL307、p SFL308の制限酵素地図を考慮するとゲノミックサザンで検出されたバンドの数から各形質転換体に導入された4' CGT遺伝子コピー数を推定することができる。

pSFL201導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。pSFL307導入系統については、系統番号2および4の個体は1コピー、系統番号13の個体では2本のバンドが見られることから2コピーの4' CGT cDNA が導入されたものと考えられる。pSFL308導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。

## 【 0 0 9 2 】

実施例12 定量RT-PCRによる導入遺伝子の発現解析

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて元株および形質転換体各系統のつぼみから total RNA を抽出し、得られた total RNA 1  $\mu$ g より Super Script<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA のうち 1  $\mu$ l を テンプレートとし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にてトレニア DFR, F3H および外来性遺伝子である AS, 4' CGT の転写産物の発現定量を行った。製造者が推奨するソフトウェア 'Primer Express' にて、各遺伝子の特異的に増幅するようなオリゴプライマーおよび特異的にハイブリダイズするような両末端を蛍光ラベルした Taq Man プローブを設計し反応に供した。また内在性コントロールとして、トレニアのグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いた。

## 【 0 0 9 3 】

反応液は、元株または形質転換体各系統の cDNA, 1x Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems), オリゴプライマー 各 100nM, Taq Man プローブ 100nM からなる 総体積 50  $\mu$ l に調整した。反応条件は、50℃ で 2 分、95℃、10 分反応させた後、95℃、15 秒、60℃、1 分の反応を 40 サイクル行い PCR での増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出した。その結果、pSFL201 導入系統では導入した AS, 4' CGT がともに高発現していることを確認した。pSFL307 導入系統では導入した AS, 4' CGT がともに発現し、内在性の DFRmRNA が元株に比べて約 10% 程度にまで抑制されていることが確認された。また、pSFL308 導入系統においては導入した AS, 4' CGT がともに発現し、内在性の F3HmRNA が元株に比べて約 5% 程度にまで抑制されていることが確認された。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 9 4 】

【図 1】植物における典型的なフラボノイド合成経路を示す。ここに記載された酵素遺伝子の有無により植物種ごとに代謝経路の末節は異なる。たとえば、黄色のキンギョソウ花卉においてはアントシアニン合成経路と共にオーロン合成に至る経路も存在するが、同じゴマノハグサ科の植物であっても、トレニアでは 4' CGT、AS 遺伝子が存在しないため、オーロンを合成することは出来ない。図中の略称については以下参照。CHS, カルコン合成酵素; CHI, カルコン異性化酵素; F3H, フラバノン 3-水酸化酵素; DFR, ジヒドロフラボノール 4-還元酵素; ANS, アントシアニン合成酵素; 3GT, UDP-グルコース:アントシアニン 3-糖転移酵素; FLS フラボノール合成酵素; FNS, フラボン合成酵素; F3' H, フラボノイド 3' -水酸化酵素; F3', 5' H, フラボノイド 3', 5' -水酸化酵素; 2' CGT, UDP-グルコース:4, 2', 4', 6' -テトラヒドロキシカルコン 2' -糖転移酵素; 4' CGT, UDP-グルコース:4, 2', 4', 6' -テトラヒドロキシカルコン 4' -糖転移酵素; AS, オーレオシジン合成酵素

【図 2】図 2 は、図 1 の続きである。

【図 3】図 3 は、形質転換体トレニアのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308 導入の形質転換体トレニア (品種サマーウェーブブルー) 葉よりゲノム DNA を抽出し、KpnI 切断後、4' CGT をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。各レーンの上の数字は導入遺伝子コンストラクトおよび形質転換体系統番号を記す。SWB は宿主サマーウェーブブルーである。M1、M2 は DIG ラベルしたサイズマーカーであり、各バンドのサイズを図の左右に記す。



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt;Suntory Limited te al.

<120>Proess for production of yellow flowers by control of flavonoid s  
ynthesis system

&lt;130&gt;1034724

&lt;160&gt;43

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;1422

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Nucleic acid in pSPB1725

&lt;400&gt;1

atg gga gaa gaa tac aag aaa aca cac aca ata gtc ttt cac act tca	48
Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser	
1 5 10 15	
gaa gaa cac ctc aac tct tca ata gcc ctt gca aag ttc ata acc aaa	96
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys	
20 25 30	
cac cac tct tca atc tcc atc act atc atc agc act gcc ccc gcc gaa	144
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu	
35 40 45	
tct tct gaa gtg gcc aaa att att aat aat ccg tca ata act tac cgc	192
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg	
50 55 60	
ggc ctc acc gcg gta gcg ctc cct gaa aat ctc acc agt aac att aat	240
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn	
65 70 75 80	
aaa aac ccc gtc gaa ctt ttc ttc gaa atc cct cgt cta caa aac gcc	288
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala	
85 90 95	
aac ctt cga gag gct tta cta gat att tcg cga aaa tcc gat atc aaa	336
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys	
100 105 110	
gca tta atc atc gat ttc ttc tgc aat gcg gca ttt gaa gta tcc acc	384
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr	
115 120 125	
agc atg aac ata ccc act tac ttc gac gtc agt ggc ggc gct ttt ctc	432
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu	
130 135 140	
ctc tgc acg ttt ctc cac cac ccg aca cta cac caa act gtt cgt gga	480
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly	
145 150 155 160	
gac att gcg gat ttg aac gat tct gtt gag atg ccc ggg ttc cca ttg	528
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu	
165 170 175	
att cac tcc tct gat tta cca atg agt ttg ttt tat cgt aag act aat	576



Ile	His	Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Met	Ser	Leu	Phe	Tyr	Arg	Lys	Thr	Asn	
			180					185					190			
gtt	tac	aaa	cac	ttt	cta	gac	act	tcc	tta	aac	atg	cgc	aaa	tcg	agt	624
Val	Tyr	Lys	His	Phe	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Asn	Met	Arg	Lys	Ser	Ser	
		195					200				205					
ggg	ata	ctc	gtg	aac	acg	ttt	gtt	gcg	ctc	gag	ttt	cga	gct	aag	gaa	672
Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Thr	Phe	Val	Ala	Leu	Glu	Phe	Arg	Ala	Lys	Glu	
	210					215				220						
gct	ttg	tcc	aac	ggg	ttg	tac	ggg	cca	act	ccg	cct	ctt	tat	tta	ctt	720
Ala	Leu	Ser	Asn	Gly	Leu	Tyr	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Tyr	Leu	Leu	
225					230				235					240		
tca	cat	aca	att	gcc	gaa	ccc	cac	gac	act	aaa	gtg	ttg	gta	aac	caa	768
Ser	His	Thr	Ile	Ala	Glu	Pro	His	Asp	Thr	Lys	Val	Leu	Val	Asn	Gln	
				245				250					255			
cac	gaa	tgc	cta	tca	tgg	ctt	gat	ttg	cag	cct	agt	aaa	agc	gtg	att	816
His	Glu	Cys	Leu	Ser	Trp	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Ile	
		260					265					270				
ttc	ctt	tgt	ttc	gga	aga	aga	gga	gcg	ttc	tca	gca	caa	cag	ttg	aaa	864
Phe	Leu	Cys	Phe	Gly	Arg	Arg	Gly	Ala	Phe	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Lys	
	275						280				285					
gaa	att	gcg	ata	ggg	ttg	gag	aag	agt	gga	tgt	cga	ttt	ctt	tgg	ttg	912
Glu	Ile	Ala	Ile	Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Gly	Cys	Arg	Phe	Leu	Trp	Leu	
	290				295				300							
gcc	cgc	att	tca	ccg	gag	atg	gac	tta	aat	gcg	ctt	ctg	ccg	gag	ggt	960
Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Glu	Met	Asp	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu	Pro	Glu	Gly	
305					310				315					320		
ttt	cta	tcg	aga	act	aaa	gga	gta	ggg	ttt	gtg	aca	aac	aca	tgg	gtg	1008
Phe	Leu	Ser	Arg	Thr	Lys	Gly	Val	Gly	Phe	Val	Thr	Asn	Thr	Trp	Val	
			325					330						335		
ccg	caa	aaa	gag	gtg	ttg	agt	cat	gat	gca	gtg	ggg	ggg	ttt	gtg	act	1056
Pro	Gln	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	His	Asp	Ala	Val	Gly	Gly	Phe	Val	Thr	
		340					345					350				
cat	tgc	ggg	tgg	agt	tcg	gtt	ctt	gaa	gcg	ctg	tcg	ttc	ggg	gtc	ccg	1104
His	Cys	Gly	Trp	Ser	Ser	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Phe	Gly	Val	Pro	
	355						360				365					
atg	att	ggt	tgg	ccg	ttg	tac	gca	gag	cag	agg	atc	aat	agg	gtg	ttc	1152
Met	Ile	Gly	Trp	Pro	Leu	Tyr	Ala	Glu	Gln	Arg	Ile	Asn	Arg	Val	Phe	
	370				375				380							
atg	gtg	gag	gaa	ata	aag	gtg	gcg	ctg	cca	ttg	gat	gag	gaa	gat	gga	1200
Met	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu	Glu	Asp	Gly	
385					390				395					400		
ttt	gtg	acg	gcg	atg	gag	ttg	gag	aag	cgc	gtc	agg	gag	ttg	atg	gag	1248
Phe	Val	Thr	Ala	Met	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Met	Glu	
			405					410					415			
tcg	gta	aag	ggg	aaa	gaa	gtg	aag	cgc	cgt	gtg	gcg	gaa	ttg	aaa	atc	1296
Ser	Val	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Val	Ala	Glu	Leu	Lys	Ile	
		420					425					430				
tct	aca	aag	gca	gcc	gtg	agt	aaa	ggg	gga	tcg	tcc	ttg	gct	tct	ttg	1344
Ser	Thr	Lys	Ala	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	
	435					440					445					

gag aag ttc atc aac tcg gtc act cgt taaag tttcttactic aatatatggg 1396  
 Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg  
 450 455  
 acatcggttt aactaccaaa ttttat 1422

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;457

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;

<223>Amino acid sequence of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcane 4'-O-glycosyltransfe  
 rase encoded in pSPB1725

&lt;400&gt;2

Met	Gly	Glu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Thr	His	Thr	Ile	Val	Phe	His	Thr	Ser
1				5					10					15	
Glu	Glu	His	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Lys	Phe	Ile	Thr	Lys
			20					25					30		
His	His	Ser	Ser	Ile	Ser	Ile	Thr	Ile	Ile	Ser	Thr	Ala	Pro	Ala	Glu
		35					40					45			
Ser	Ser	Glu	Val	Ala	Lys	Ile	Ile	Asn	Asn	Pro	Ser	Ile	Thr	Tyr	Arg
	50					55				60					
Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Ala	Leu	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn
65					70				75					80	
Lys	Asn	Pro	Val	Glu	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Pro	Arg	Leu	Gln	Asn	Ala
			85					90					95		
Asn	Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	Lys	Ser	Asp	Ile	Lys
		100					105					110			
Ala	Leu	Ile	Ile	Asp	Phe	Phe	Cys	Asn	Ala	Ala	Phe	Glu	Val	Ser	Thr
		115					120					125			
Ser	Met	Asn	Ile	Pro	Thr	Tyr	Phe	Asp	Val	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Leu
130					135					140					
Leu	Cys	Thr	Phe	Leu	His	His	Pro	Thr	Leu	His	Gln	Thr	Val	Arg	Gly
145					150					155					160
Asp	Ile	Ala	Asp	Leu	Asn	Asp	Ser	Val	Glu	Met	Pro	Gly	Phe	Pro	Leu
			165						170					175	
Ile	His	Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Met	Ser	Leu	Phe	Tyr	Arg	Lys	Thr	Asn
		180						185					190		
Val	Tyr	Lys	His	Phe	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Asn	Met	Arg	Lys	Ser	Ser
		195					200					205			
Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Thr	Phe	Val	Ala	Leu	Glu	Phe	Arg	Ala	Lys	Glu
210					215					220					
Ala	Leu	Ser	Asn	Gly	Leu	Tyr	Gly	Pro	Thr	Pro	Pro	Leu	Tyr	Leu	Leu
225				230						235					240
Ser	His	Thr	Ile	Ala	Glu	Pro	His	Asp	Thr	Lys	Val	Leu	Val	Asn	Gln
			245					250						255	
His	Glu	Cys	Leu	Ser	Trp	Leu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Ile
		260					265					270			
Phe	Leu	Cys	Phe	Gly	Arg	Arg	Gly	Ala	Phe	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Lys
		275					280					285			
Glu	Ile	Ala	Ile	Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Gly	Cys	Arg	Phe	Leu	Trp	Leu
290					295						300				

Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val  
 325 330 335  
 Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr  
 340 345 350  
 His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro  
 355 360 365  
 Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe  
 370 375 380  
 Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu  
 405 410 415  
 Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile  
 420 425 430  
 Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu  
 435 440 445  
 Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg  
 450 455

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT

&lt;400&gt;3

gaaatggtcg gattggctgg g

21

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT

&lt;400&gt;4

acctccaccc caactttcag g

21

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT  
<400>5  
gatgcataat ttggctagaa aagc

24

<210>6  
<211>21  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT  
<400>6  
ccaatttgcc aaacactttc c

21

<210>7  
<211>21  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT  
<400>7  
tgcctcgaat gggtgagcac g

21

<210>8  
<211>18  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT  
<400>8  
ctctcactct cacacccg

18

<210>9  
<211>21  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT  
<400>9  
cacgaatgct tagcatggct c

21

<210>10  
<211>21

<212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT  
 <400>10  
 cttattgccc actgaaaccc c 21

<210>11  
 <211>21  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT  
 <400>11  
 tgtctgaatt ggcttgattc c 21

<210>12  
 <211>21  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT  
 <400>12  
 aaccacaga aaccctgtt c 21

<210>13  
 <211>1446  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB264  
 <400>13  
 atgggaaaac ttcacattgc cttatttcca gttatggctc atggtcacat gatcccaatg 60  
 ttggacatgg ccaagctctt tacctcaaga ggcatacaaa caacaatcat ttcgactctc 120  
 gccttcgctg atccgataaa caaagctcgt gattcgggcc tcgatattgg actaagcatc 180  
 ctcaaattcc caccagaagg atcaggaata ccagatcaca tggtagacct tgatctagtt 240  
 actgaagatt ggctcccaaa gtttggtgag tcattagtct tattacaaga gccagttgag 300  
 aagcttatcg aagaactaaa gctcgactgt ctctgttccg acatgttctt gccttggaca 360  
 gtcgattgtg cggctaagtt cgggtattccg aggttggttt tccacggaac gagcaacttt 420  
 gcgttggtgtg cttcggagca aatgaagctt cacaagcctt ataagaatgt aacttctgat 480  
 actgagacat ttgttatacc ggatttcccg catgagctga agtttgtgag gactcaagtg 540  
 gctccgtttc agcttgcgga aacggagaat ggatttctca agttgatgaa acagatgacg 600

gagtctgttg	gtagaagcta	cggtgttgtg	gttaacagtt	tttatgagct	cgagtcgact	660
tatgtggatt	attacagaga	ggttttgggt	agaaagtctt	ggaatatagg	gcctctgttg	720
ttatccaaca	atggcaatga	ggaaaaagta	caaaggggaa	aggaatctgc	gattggcgaa	780
cacgaatgct	tggcttgggt	gaattccaag	aagcagaatt	cggttgttta	cgtttgtttt	840
ggaagtatgg	cgactttttac	tccagcgcag	ttgcgcgaaa	ctgcgattgg	actcgaggaa	900
tcaggccaag	agttcatttg	ggtagttaa	aaggccaaaa	acgaagaaga	aggaaaagga	960
aaagaagaat	ggctgccaga	aaattttgag	gaaagagtga	aagatagagg	cttgatcata	1020
agaggatggg	cgccgcaatt	gttgatactc	gatcatcctg	cggtaggagc	tttcgtgacg	1080
cattgtggat	ggaattcgac	gttggaagga	atatgcgccg	gtgtgcctat	ggtgacttgg	1140
ccagttttcg	cagagcagtt	tttcaatgag	aagtttgtga	cagaggtttt	ggggaccggt	1200
gtttcggttg	ggaataagaa	gtggctaagg	gcagcaagtg	aagggtgtgtc	gagggaggga	1260
gtgacgaacg	cggtgcagcg	tgttatgggt	ggagaaaatg	cgtcggagat	gagaaaagca	1320
gcgaagtatt	ataaggaaat	ggcgaggcgg	gcggttgagg	aaggcggttc	gtcttataat	1380
ggtttgaatg	agatgataga	ggatttgagt	gtgtaccgtg	ctccagaaaa	acaagactta	1440
aactag						1446

&lt;210&gt;14

&lt;211&gt;1488

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB662

&lt;400&gt;14

atggccctttc	aaattcaacc	agagcttcta	aacttcgttt	tcataccatt	catggcccct	60
ggccactcaa	tccctatgat	agacttagcc	aaattattcg	cggaacgcgg	cgtcaacgta	120
acgatcatcg	taacacctct	taacgccgca	cgattcaatt	ccgttattaa	tcgagccggt	180
gaatcaggac	agtccattcg	tcttctccaa	gtaaaattcc	ctggtgaaga	agccgggttg	240
ccacctggat	gcgaaagcgc	cgagacttta	ccatcttatg	aattgattcc	aaatTTTTTT	300
accgccgtaa	aatgtttaca	acaaccaatc	gaggaagaat	tgagaaatTT	gatcccttta	360
ccaagctgcg	tcattttgtga	taaacacata	ccctggactg	ctcaaactgt	caagaatctc	420
cgaattccga	ggataatttt	cgatggaatg	agctgttttg	ctcctttagt	aacacacggt	480
ctctacgtgt	ctaaggttca	tgaaacctgt	cctccaaacg	agccgttcgt	tgttctctgat	540
ttccccgatg	agatagagtt	aacgagggtt	caattgccag	ggttggtgaa	tccaagtcca	600
aggataaatt	tttacgattt	tcgcgaacaa	gtgaagaaaa	ctgaggagga	ggcttatggg	660
gtggtggtga	acagttttga	ggagctggaa	aaagattatt	tcgagatgtt	tcggaaattg	720
aaagggggta	aagtttggtg	tgttgggcct	ttgtcgcttt	atggtaacga	cgatttggac	780
agggctggaa	gaggggaata	ggcgtcgatt	gatacggatc	ggtgtatgaa	atggcttgat	840
gatatgaaac	cagaatctgt	aatttatgcc	tgtttgggaa	gcctgagtcg	tttgtcgcgt	900
tcacagttcg	tcgaacttgc	tttgggattg	gaagcatcaa	aacactcggt	tgttctagtt	960
gttaaaaccg	aaggagagaa	gtcgttggaa	atagagaaat	ggatttttga	caatggattc	1020
gaggaaagaa	cgaagatag	agggttcttg	attcgtgggt	ggtcgccaca	agtgttgatc	1080
ttgtcgcatt	ttgcagtggg	aggattcttg	acgcatttgt	gttggaattc	gacgcttgag	1140
ggcattttgt	ctggtttgcc	aatgggtgat	tggccgatgt	tcggcgaaca	gtttttgaat	1200
gagaagttag	tgggtgcagat	tttggggacg	ggtgtgggag	ttggagcgaa	aagtacggta	1260
cattttggggg	atgaagagat	ggatgagatg	agagtgcaga	ggaaggggat	taccaaggcg	1320
gtcgtggcag	ttatggatag	aggaactgaa	gggtgtgaga	ggcggagaaa	ggcgaaggag	1380
cttggtgaaa	tggctaagag	ggcagtccaa	gttgggggat	cttcatgtaa	gaatgtcgac	1440
cagctaattc	aagaagttgc	accattgagt	gtagcgaggg	atgtgtaa		1488

<210>15  
 <211>1446  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB1621  
 <400>15

atgggtttctc	tccctgaaaa	tgagctcaac	aaaccacatg	ctgtgtgcat	accctatcca	60
gcactagggc	atttcagtcc	catgctagat	tttgctaagc	tcctccacca	aaaaggcttt	120
cacataacct	tcgtcaacac	cgagtacatc	cgtctccgcc	tcctcaagtc	ctgtggccct	180
gccgcccttg	acgggctacc	ggactttcgc	ttcatgacta	tccccgatgg	cctccctttg	240
tcggacgacg	tttcgcgtga	tgtcgcttcc	atttctgtct	ctactaacia	aacttgctta	300
gaaccctttt	gtgaggtgct	atcggacctc	atggataatg	gttccaaccc	gccggtgagc	360
tgcatttgtt	ccgacggggt	aatgagtttc	acccttgagg	cggcggagag	gtttggactg	420
ccagaggtgc	tgttctggac	gcccgcgtgc	tgtggcatct	tagctttcac	gcagtataag	480
catcttgttg	agagaggata	tgtacctctc	aaagatacga	gccaggtaac	aaatggctac	540
ctggaaacia	tattagattg	ggttccaggg	atgaaggata	ttcgattgag	ggaattccca	600
actttcataa	gaacgacgga	cccaaacgac	gttatgctgg	attttctaata	aaaacaagtt	660
gacgccaccc	cgaagccaa	tgtgtgtgatc	atcaacacgt	tcgacacatt	ggaaagtgc	720
gctctcaacg	ccctctctgt	catgtttccg	cgcataatac	cactcgggcc	tctccatatg	780
atgttgaata	atcccagagt	cgacgaaccc	tctaattgcaa	tcaaatttaa	tctttggaaa	840
gaagactcac	attgcctaga	ttggctcgat	gtgaacgagc	ccgcatcagt	tgtatacgtg	900
aattttggca	gctcaacaat	tctgactgtt	gaacaactaa	ctgaattagc	atggggcctt	960
gctaacagca	agaaaccgtt	cctttggatc	atcaggcctg	atttagtaac	tgggtgcatcc	1020
tccatgcttc	cgcctgagtt	cctggctcgag	actaaagaca	gaagcatgtt	agtgagttgg	1080
tgaaccaag	aacaagtgtt	gaagcacccc	gcgactggag	tgttcttgac	gcattgtgga	1140
tggaaattcg	cgattgaaag	catttgcagc	ggcgtgccaa	tgatttgttg	gccttactac	1200
gctgagcagc	aaaccaactg	taggtacagt	tgtgtggaat	gggaaatagg	aatggagatc	1260
attgacaacg	atgtgaagag	agatgaggtg	gaattgctgg	tgattaagtt	gatggatggg	1320
atcaagggaa	agaaaatgaa	aaagaaagct	atggagtggg	agaggaaagc	agaagaggcg	1380
gtagcttttg	ggggctcttc	ctacatgaat	ttggataaac	ttattagcga	cgtgcttttt	1440
ccataa						1446

<210>16  
 <211>1458  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB1620  
 <400>16

atggcaggtc	caaattgcaa	gcctcacgcc	atcatgatcg	cacttcctta	ccaaggccac	60
ataactcctt	ttgtcaatct	tgcactaaaa	cttgcttcca	atggctttac	aatcactttt	120
gttcaccttg	aattttatcca	ccaaatgttg	tctaaagccc	ataacgccac	taaaactgaa	180
gcagatttat	tttcggaagc	acgagaatcc	ggctctcgaca	tacgttacac	aacgattgac	240
gatggtttcc	citttggatt	cgacagggtc	ctccactccg	aggagtattg	gcactccatg	300

ttgcgagatt	tcccgttaca	cgtcgatgag	tttgttcgaa	aagtcgtgga	gtcagagcca	360
tttttagagc	actttttggt	tacggatact	atgtatacat	ggcctgcaac	cattgcaaag	420
aaacataatc	ttgtgaatat	ttcgttttgg	actgaaccag	ccctgggtgtt	ttctttgtct	480
taccatataa	accttctgaa	gcaaaaatggt	cattttccat	gtaaagaaaa	tattgatgag	540
gaaataaatt	acgtaccagg	agttgattca	ataagtacaa	gggatttaaat	gtcttatttt	600
aaagaaccag	gatcagaaac	attagagaaa	aatgtttgtgc	tcaaggcatt	tgaaggagt	660
aagaaagctg	atttcatctt	gcataacaca	ttgcaagaac	tagaatctga	gacactctca	720
gctcttacca	aaatgcagcc	aaattacgcc	gttggacctt	ttaattttctc	caaacatact	780
cctaaaactg	tcaccaagag	tctacgggtc	gaattcgact	gcaccaactg	gctcgactct	840
aagcctccca	actctatttt	atacgtctcg	tttggtagtt	ttattcagac	aagcaaagag	900
gtaattgaag	aaatcgctta	cggctcttct	cctagtgaag	ttaactttat	atgggttggtt	960
agaacagata	gtgtgagttt	agaggataac	gaggttttgc	cggttggatt	tagggatgag	1020
gttaaagata	gggggttgat	agttccgtgg	tgtgatcaaa	ttacggtttt	gtctaactcg	1080
gcggttggag	gattcttgac	gcattgtgga	tggaactcgg	tattagagag	tatgtggtgt	1140
ggcgttccta	tgattttgta	tccgttaaca	tatgatcaac	ctactaatag	gaaactattg	1200
gttgatgatt	ggaagattgg	cattaatctt	tgcgacggag	cgttgattaa	tagaaaagaa	1260
attgcagaga	agattaaggc	cttgatgagt	gaaagtactt	cagaggggtt	gaggggaagaa	1320
tctgagaaa	ttaagggctt	gttgaagaat	gcactggaag	ttggtgggtc	atcagagaag	1380
aatttcaata	aatttattga	ggatttgaag	gcaaaaattc	aaataatgaa	agagcaaatg	1440
cctgctaata	ccagttga					1458

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;1443

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1622

&lt;400&gt;17

atgggttcca	cagccgaaaa	taaacagaaa	acccacattg	tgtgcatacc	ctaccagacc	60
caggggcaca	tcagcccat	gctaaagtta	gccaaactgc	tacaccaaaa	cggcttttac	120
atcacttttg	tcaacacgga	gtacaaccac	cgccgcctca	tcaagtcccg	cggcccccacc	180
gccctcgacg	gattgcccga	tttccgggtc	gttacgatcc	ccgacgggct	tcctttctct	240
gaagccgacg	ccacacagga	tatcccttct	ctttgtgttt	caaccaccaa	cacttgcttg	300
gagccctttt	gcgagctgct	gtcgaacctc	aataactccg	gcccggacgt	gcccccggtg	360
agctgcatcg	tatccgatgg	tgtcatgagc	ttcacgttga	aggcggcgga	gagatttggg	420
ctgccggagg	tgctgttctg	gacgacgagt	gcgtgtgggt	tcttggcgta	tacgcagtat	480
aagcatctcg	tggagaaagg	ctatgtaccc	ctcaaagata	tgagccaagt	aacggatgga	540
tatttgaaaa	caagcatgga	ctggattcca	ggaacgaagg	acatccaact	aagggacttc	600
ccctctttca	tcaggacaac	agatccagaa	gacatcatgc	ttaatttttt	aatacaagaa	660
actgatgttg	ttccgagagc	caaagctgta	ataatcaaca	ccttcgacat	gttagaacac	720
gacgtcctgg	aagcgtcttc	caccatgttt	tcacgcgttt	acagcatcgg	ccctcttcag	780
ctgatgatga	attatgttca	caacgagtc	cttaaattcca	tcagttccag	tctatggaaa	840
gaagaaacac	attgcgtcga	ttggctcgat	tcaaaggagc	ccgaatccgt	tgtgtacgta	900
aattttggca	gcataactgt	cgtgactgca	gaacaactga	ctgagtttgc	gtgggggctc	960
gctaatagta	agaagacttt	cctatgggtt	attaggcctg	atatagtgtc	tggagactcg	1020
gctatgctgc	cccctgaatt	cgtgacgggg	acaaaagata	gaagcatgtt	aatcagctgg	1080
tgtaaccaag	aacaggtgtt	gaatcaccca	tcaattggag	ggtttttgac	gcacagtgg	1140
tggaattcga	cgattgaaag	tatagtcgag	ggagttcctg	tgatttgctg	gcctttcttt	1200



gctgagcagc	aaacaaattg	taggttcagt	tgcgtggaat	gggaaatagg	aatggagatt	1260
gataataatg	tgaagagaga	tgaggttgaa	gttttgggtga	gggaattgat	ggatggagag	1320
agggggaaga	aaatgaagga	gaaagctatg	gagtggaaag	ggaaagcatt	agaggcaact	1380
gcacttgggg	gctcttccta	cttgaacttg	gaaaaactaa	ttaaggaggt	gcttttgcatt	1440
taa						1443

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;1407

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1610

&lt;400&gt;18

atggcatctt	ctccccataa	ccagccaacc	acgccccgcc	acgtgggtggc	cctaccctac	60
cccggccgcg	gccacataaa	ccccatgctc	aacatctgca	aagccgtagc	ggagaagagc	120
agccacatca	acataacaat	catcctaacc	gaggaatggc	tcggcttaaat	cggctcagcc	180
gacaagccgc	cgaacataag	ctacgccgcg	ataccgaaca	ttctgccgtc	ggagcacgtt	240
cgcggcgagg	atccacatgg	tttttgggcg	gctgtttggc	agaagatgga	ggagccggtt	300
gatcggctgc	tggacgagct	tcggcttaaat	aataacaagc	cggagtittgt	gatagccgat	360
gctttcttgc	attgggcggc	tgacgtggcg	ggcaggagga	atattccctt	ggcatctgtt	420
tggccaatgt	cggcgtccac	gttcacggtg	ctttaccact	ttgaccttct	cgttgaccac	480
ggacactttc	cgatcgacat	accagtgaat	ggagatgcta	ttgtggatta	catcccggga	540
ctccctccag	ttcgcgtcgc	agattttcca	aaagacataa	gaaaacaaga	agacgcatcc	600
ttcgtcctta	aactcattcc	caactcacca	aaattcatca	tcttcacttc	aatttacgac	660
ctcgaatcca	agatcatcga	cgctctaaag	caaaaatctt	ccttctcaat	ctacaacatt	720
ggtcctcatg	cttcctattc	caaaactcaa	cacatcctca	actcggataa	aatcacgaaa	780
cctgatcaag	ataaccccgga	ctacttaaaa	tggtttagatc	tccaacctcc	caactccgtc	840
ttgtacattt	cactcggcag	tttcctatcc	atttcgcgag	cccaaattgga	tgaactcgca	900
accggaatac	gaaactcttg	tgtccgcttt	ttgtgggtgg	cacgtggcga	aacaaaccgg	960
ttgaaagaga	tttgttgtga	tcatgaaaag	gggctgatca	tagaatgggtg	cgatcaaattg	1020
caggttcttt	ctcattcttc	ggttggtgga	ttcttgtcgc	attgtggttg	gaattcgact	1080
aaagaggcgt	tgatggccgg	ggtgccgttt	ttgactattc	caattatgtt	tgatcaagtg	1140
tctaacgcga	aggcggctcg	ggaagattgg	agggtggggt	ggagggtggg	gaatgagttt	1200
aatgaagaag	agttgggtggg	aggagatgag	attgcgaata	ttgtgaggag	gtttatggat	1260
atggaaaatg	gtgagaggaa	agagttgacg	aaaaatgtga	aagagggtgca	gaagatttgt	1320
gcgagagagt	tcgaagatgg	agatggacag	tcgtttgagt	ttaatgttga	aagtttggtt	1380
caattgattc	tgcaattggg	tccgtaa				1407

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;1428

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1609

&lt;400&gt;19

atgaacaaca	caaccaaca	acaaacagta	gcattagcac	tagcacctca	ctgtttaatc	60
------------	-----------	------------	------------	------------	------------	----

gtccattcc	cattccaagg	ccacattaac	cccttactcc	aattcgccaa	acgcctcata	120
actcaccaca	acaaaaacct	ccaaatcaca	ttcgcactca	ccaaattcat	cctcaccaac	180
ctctcctccg	gtgccggaga	atcatccttc	tctctccggt	caatctccga	cggcttcgac	240
gccggcggcc	gcgctcaggc	caactccggc	gccgaatacc	tctccaaatt	ccgcgagatc	300
ggatctcaaa	ccctaaccga	acttatccaa	gacctatccg	aatcggttcg	acccgttgac	360
tgcgtggtct	acgacccgtt	cgtaccttgg	gccttagatg	ttgccaaagg	taaattcgga	420
atttcaacgg	cggcggtttt	tacgcagtcg	tgtgcggttg	ataatatata	cagtcgggtt	480
tataacggcg	atttggagct	gccgttgccg	gagaatgagg	tggttagggt	tccgggtttg	540
ccggagatgg	agccgtttga	gatgccgagc	tttgtgtatt	taaacgggtc	gtacccgtcg	600
agttttgaga	tggttgtggg	tcagtttagg	aatgttgatg	aggcggattg	ggtttttgtc	660
aacacttttt	atgagttgga	gaaagaggtc	attgactgga	tgtcaaaatc	ttggcgagtg	720
aaagcaattg	gacctaccat	accatcaatg	ttcatggaca	agagattgca	agaggacaaa	780
tcatacggtc	ttagcatgtt	caagcataca	acaaatgact	gcataaattg	gctcaacgga	840
aaacaatcaa	aatccgtcat	ttatgtcgcg	tttgggaagtc	ttgcagaatt	atcccacgac	900
caaactcaag	aactggcaca	cgccttaaca	acctacgaca	aacacttctt	atgggttgta	960
cgatcatcgg	aagaagctaa	gcttccccaa	aattttgcta	acgaaacatc	taagaaaggg	1020
ttgatagtgt	cgtggtgccc	tcaattagag	gtcttgtcgc	acgaggccat	cggttgtttc	1080
gtgactcatt	gtggtttgga	ttcaacgctc	gagggattga	gtttgggggt	gcctatggtg	1140
gcgatgccac	agtggacgga	tcagagtacg	aacgctaagt	ttatcgtgga	tgtttggggg	1200
gtgggtgttc	gggctaagg	ggacgagggg	ggattagcga	ggcaagatga	gatagttcgt	1260
tgcttaggga	gcgtcatgga	aggggagaa	ggagaaaaga	taagaaagaa	tgcgaaatgaa	1320
tggaaggaac	gggcgtgcaa	tgcagttgat	gaagggggga	gttcagacaa	aaatattgaa	1380
gaatttgta	ctacgttgat	aagttcccat	gacttgcgtc	aagagtaa		1428

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt;1425

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1617

&lt;400&gt;20

atgtctagtg	agagccaaat	aaacttagtg	ttcatccctc	tccctgtaaa	gggacacatt	60
gtctcaacgc	tagagacggc	aaagctactc	gtcgatcgaa	acaaacgcct	caccatcaca	120
atcctcctca	tgaagctgcc	agtcgacgcc	aaggtagatg	attccttcac	aaaaaatccc	180
tcctgctctc	aaataacttt	tgtacatctc	cctcgaatcg	agcacagttc	catggaacca	240
ccgggaactc	ccgaatcctt	tgtacacagg	ttcgtcgaga	gccaaaaatg	tctcgtaa	300
gatgcggtgg	ttaaagcaac	ggagggctca	aaatcaaaca	ggctagccgg	atttgaatc	360
gacatgttct	gcaccccgat	gattgatgtg	gccaatgaat	ttggcgctcc	gacatacgtg	420
gctttcacgt	ccggggccgc	aactctcggg	ctattgttcc	atttgcagag	tcttagagat	480
gaattttaac	aggacgtgaa	ggagtacgag	aactcgggaag	ttgagatata	gatcccggct	540
tatgttaacc	cgttcccttc	caaatacctt	ccgtctcctg	tcttcaacga	ggacggtgtt	600
tttcttagtc	ttgcaaagg	gttcagagag	gctaaaggta	tattgatcaa	caccttttta	660
gaatttgaat	cccatgccat	taaatcgctc	tccaacgatg	cgagaatccc	gcctgtttac	720
cccatcgggc	cagtaattca	cgccacggaa	gataatgcaa	acaaaggaaa	gcaggacgaa	780
atcatcgctg	ggcttgacga	gcaacctgat	tcatccgtcg	tgtttctttg	cttcggaagc	840
gctggatgct	ttgaagaaaa	tcaagtgaag	gagattgcag	tggcgctcga	caaaagtgga	900
taccggtttt	tatggtcatt	gagaaagccg	cctcccaaag	aaaaagcgga	gtttccaggg	960
gagtacaaag	attttaatga	agttttacca	gaagggttct	tacaacgtac	gtccgggaga	1020

ggtaaggtaa	taggatgggc	tccgcagatg	gccgtgttgt	ctcacaatgc	ggtgggagga	1080
ttcgtgtcgc	attgcggctg	gaactcgacg	ttggagagtg	tttgggtcgg	agtgccaatg	1140
gccgtgtggc	cattggcggc	cgagcaacat	gcgaacgcgt	tccagttggt	gaaggagtig	1200
ggaattgcgg	tggagattaa	gatggattat	aggaagaaca	gtgggtgtgat	tgtggaggca	1260
aaaatgattg	agaaaggaat	cagggagtig	atggacccgg	aaaatgagat	aaggggtaat	1320
gtgaaagtga	tgaaaaagga	gagtaggaNa	gctgtcgtgg	atgggtgggac	ttcttttgat	1380
tacttggatc	gttttgttga	aactgtcgtg	aataatgttt	tgtga		1425

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt;1446

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1615

&lt;400&gt;21

atgggttccg	tagccggaaa	cagttacaaa	cggcctcatg	ctgtgtgcat	acccttcccc	60
gcgcaggggc	acatcaaccc	catgctgaag	ttggccaaac	tcctccacca	aaagggcttc	120
cacatcacat	tcgtcaacac	agagtacaac	caccgccgt	tgctcaagtc	cctcggcccc	180
gacgtctctg	atggcttgcc	ggatttccga	ttcgcaacca	tccccgacgg	tcttcctccg	240
tctgacgcgg	acgtcactca	ggatgttcct	tctctttgta	tgtccaccac	taacacttgc	300
ttggagccct	ttaccgagtt	gctgttgaaa	ctcaataact	ccggccccga	cgtgccaccg	360
gtgacctgca	tcgtctcgga	tgggtgtcatg	agcttcacat	tgaaggcggc	ggagaggttt	420
gcgctgccgg	aagtgtctgtt	ctggacgacg	agtgcgtgtg	gtttcttggc	gtacacgcag	480
tataagcgtc	tcttggagaa	aggctatgtc	cctctcaaag	atatgagcca	gttaacaaat	540
agctatctgg	aaacaaccct	cgactgggtt	ccaggaatga	aggatatccg	attaagggac	600
ttcccatcat	tcatcaggac	aacggatcca	aaagacatca	tgtacaatit	cgtattacaa	660
gaaaccgacg	ctgtctccag	agccaaagct	ctgatcatca	acacctttca	tacattggaa	720
cacgacgttg	taaatgccct	ctccaccatg	tttccacgtg	tttacaccat	cggctctctt	780
cagctgatgt	tggaccaagt	tcatgacaag	agccttaacg	ccatcaactc	caatctctgg	840
aaagaagaat	cgcaatgcat	cgattggctc	aattcaaaag	agcccgaatc	cgttgtgtat	900
gtgaatttcg	gtagtgtcac	tgttgtgact	gctcaacaac	tgacggaatt	tgcgtggggg	960
cttgcgaaca	gcaacaagac	ttttttatgg	gttattaggc	ctgatatagt	tgttggagac	1020
tcggcaatgc	tgccccctga	attcttgacg	gacacggaag	acagaagcat	gctaataagc	1080
tgggtgaacc	agaacaggt	gttgaggcac	ccttccatcc	gaggattttt	gacgcacagt	1140
ggttggaaact	cgacgcttga	aagtattgtc	agcggagtgc	ctatgatatg	ttggcctttc	1200
tttgcctgagc	aacagacaaa	ttgtagggtc	agttgcgtgg	aatgggaaat	aggaatggag	1260
attgacaata	atgtgaagag	agatgaggtt	gaggtgctgg	tgagagagtt	gatggatggt	1320
gaaaagggga	agaaaatgaa	gaagaaagct	atggagtggga	agatgaaagc	agaagcagca	1380
gctgcccctg	ggggaccttc	gtcttttaaat	ttggaaaaac	ttattgagga	ggtgcttttg	1440
caataa						1446

&lt;210&gt;22

&lt;211&gt;1308

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB660

&lt;400&gt;22

atgaaggctc	atgcagtgat	gcttccttgc	cccgtacaag	ggcacttaaa	tcctatgctg	60
aaactggcca	aaatatgtga	ttcaagaggc	ttcttcatca	cattcgtgaa	cacggaattc	120
aatcacaatc	gtctagtgcg	tgcgagaggc	cccgaatctg	ttaaaggctc	cgatgatttt	180
cagttcaaaa	ccatacctga	tggactaccg	ccttttgata	aggacgcaac	gcaagacata	240
cctcaactgt	gtgatttctt	tcaaaaagaat	ggtcttcttc	cattgttgga	cctcattaaa	300
agtattaatg	attcaccgga	ctgtccaaat	gttacctgta	tagtgattga	tttggccatg	360
agtttcgctc	ttgatgcggc	cgagggtgtc	aaaattccca	cgggtgtactt	ttcgccaact	420
agtgccttg	gattcatggg	gttttgcaat	tatgaagagc	ttgtgaatcg	aggattgttt	480
ccacttaaa	atgaaagtca	aataactaat	ggctatcttg	ataccaaaact	agactgggtg	540
ccagggatga	agaacattag	gctcagagat	tttcctagtt	tcatccgaac	gactgatcca	600
gatgatatca	tggtgaactt	catgattttt	aacatgaaga	atgcgcctcg	tgcaaaggct	660
gtggtagtca	acacattcga	tgaattggag	aaagatgtat	tggaggccct	aagtaaaaaa	720
tttgatcatg	ttttttccat	aggcccactc	caattgatgg	agaaggcttt	ccaaaagcct	780
gaggtaaaat	ctataggatc	aagcttgtgg	aaagaagaca	acacgtgcat	cgcctggctc	840
aacggcaggg	agccaaattc	tgtgttgtag	gtgaactttg	gaagcatcac	agtgttgtca	900
cctcaacaac	tattggaggt	cgcattggggc	ctagccaata	gcaaccatta	ctttttgtgg	960
atcataaggc	cagatttggt	aagtggagaa	tctgcgattt	tatccgaaga	gtactcaaag	1020
gaagttgaag	ggcgggcat	gatgggtcgt	tggtgctctc	aagagcaagt	attggcccat	1080
ccttcggtag	gtggattctt	gacacattct	ggctggaact	cgactatcga	aggaatgtca	1140
gaaggtgttc	ctatgatttg	ttggcctttt	tttgcgtacc	aacagaccaa	ttgtcggtat	1200
gcattgcacg	agtgggagat	tggaaatggag	attgaaggag	aggttacgag	ggataaagtg	1260
gcggatttgg	tgaaaatatt	gatggaggag	ggaaggggag	agcgatga		1308

&lt;210&gt;23

&lt;211&gt;1506

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB658

&lt;400&gt;23

atggccattc	atgaacaaaa	acctcacttt	gtcctgttcc	ctttcatggc	acaaggccat	60
atgattccca	tggtagatat	cgccagatta	ctcgcgaagc	gcggtgtcac	aatcaccatt	120
ctactcacac	cccacaatgc	caacagggtc	aaaacagtca	ttgctcgtgc	aatcgattca	180
ggactaaata	tcaatgtcat	ccacttcaaa	tttccatccg	ttgaggctcg	attgcccga	240
ggttgtgaga	atttcgatat	gtccctgac	atcaatggcg	cattgcagtt	tttcaaagcc	300
actttcatgt	tacaagaaca	ggtcgaagag	ttgcttccaa	agctcgagcc	tcttccgagc	360
tgccataattg	ctgatattgt	ctttccatgg	acaacaaatc	ttgctttgaa	gttaaatgtt	420
ccaagaattg	tgtttcacgg	gacaagttgc	ttttctctcc	tatgtatgca	cgttttagga	480
acttctaagg	atttcgaagg	tgtgactaac	gaaacggagt	acttccttgt	gcctggatta	540
ccagataaaa	tcgaaataac	caaaattcag	cttaggggca	cccttattca	aatgaattca	600
gactggacga	agtttcgtga	tgagggtgca	gaggctgagg	taaaagcatt	tggaacgggtg	660
gccaaatactt	ttgaagattt	ggaaccagag	tatgtcaaag	aatacagcag	agttaaaggc	720
aaaaaagtct	ggtgcatagg	tcctgtttca	ttatgcaaca	aagatggcat	agacaaggcc	780
gaaagaggta	acatggcttc	aatcgacgca	caccattgct	tgaagtggct	caattcacac	840
gaacaaaagt	ctgttattta	cgtctgcctt	ggaagcatat	ctcgcctcgc	tacttcacaa	900
ctgatagagc	ttggattggc	tttagaagca	tcaaacagac	cttttatttg	ggtagttaga	960

gatccatcac aagaacttaa aaaatggttt ttgaatgaga aatttgagga aagggtaaag 1020  
gatagaggcc ttttgatcaa cggttgggcg cctcaagtgc tcatactttc ccatccatct 1080  
gttggagggt ttgtaacgca ctgcggctgg aactcgatgc ttgaaggggt tacttcaggc 1140  
ttgccgatga taacgtggcc tgtatttgct gagcagtttt gtaatgaaaa gtttattggt 1200  
cacgtgatca agactgggat aagagtgggt gttgaagtgc ctatcatctt tggagatgaa 1260  
gaaaaagtcg gagtttttgt gaagaatgat gagataaaga tggttataga taagttgatg 1320  
gatggaggag aagagggaga agagagaaga gagagagctc aaaagcttgg agaaatggca 1380  
aaaaaggcaa tggaggagggt tggttcttct tatcataatt tgacatcggg catgcaagat 1440  
gtcatgatgc aacaagctaa taatggagat caatatgaag atggtgttac agttataaat 1500  
acatga 1506

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1617BamHINcoI-FW

&lt;400&gt;24

gggggatcca tggctagtga gagccaaata 30

&lt;210&gt;25

&lt;211&gt;36

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1617XhoIKpnI-RV

&lt;400&gt;25

cccctcgagg gtacctcaca aaacattatt cacgac 36

&lt;210&gt;26

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1617-F

&lt;400&gt;26

atgggagaag aatacaagaa aaca 24

&lt;210&gt;27

&lt;211&gt;26

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1617-R

&lt;400&gt;27

taaaatttgg tagttaaac gatgta

26

&lt;210&gt;28

&lt;211&gt;1386

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1721

&lt;400&gt;28

atgctgagcc	tcgccaaaat	tctgcaccaa	aagggtattcc	atatcacttt	cgttaacact	60
gaatttaacc	atgaacgcct	cctgagaacg	agaggcccga	attcccttga	cgggttgcct	120
tcgtttcgat	tcgagacaat	tcccgacggt	cttccgccat	cagaccccga	tgctacacaa	180
aacgttgcat	tattgtttga	gtccagcaca	tccaaatgct	tagctccatt	cagggacctt	240
cttgctaagc	taaaccacac	cgacgtgccg	ccagttactt	gcatactatc	cgacttaatc	300
atgagcttca	ctcttgaagc	tgctcaagag	ctcagcatcc	ctgatgtcct	tttttggacc	360
gctagcgctt	gtggatacct	cgcttatgca	cactatgcc	cgcttattga	aaaaggattt	420
acacctttca	aagatacgag	ttgcttgacc	aatgggtatt	tggataccgt	tattgatgat	480
attcctagtc	tggaaaggcat	acgtctgaga	gacattccaa	gttttatcag	aacaactaat	540
ccagatgaca	ttttgatgaa	ctttgtgttg	cgagaaacag	agagagctag	aaaaggttcc	600
gccgtaatct	ttaacacgtt	cgagtgcctc	gagggttgaag	cattaaacgt	actttcatcc	660
atgttgccctc	cagtttacac	agttggacc	ctgcatttgg	ttgaaaagca	tggtggtcac	720
aaaggattgg	aggtgcttgg	atcaaattta	tggaaagaag	agccaaaatg	tctcgaatgg	780
cttgactccc	aaattcccaa	ctcagtgggt	tacgttaatt	ttggaagcat	cgctgtcatg	840
acaactgacc	aactgattga	gttttcttgg	ggtcttgcta	atagcaacat	atccttcttg	900
tggattataa	gacctgacct	tgtctcaggg	gaaaacgctg	ttcttccacc	cgaatttctc	960
gaagccacaa	aagaaagagg	gtgttttagca	aattgggtgcc	ctcaagagaa	agttcttagc	1020
cacccatcca	tcagaggatt	cttaactcac	agcggatgga	attcaactct	tgagagcatt	1080
tgcagtggag	ttccaatgat	cagttggccg	ttcttcgccg	aacaacagac	taactgttgg	1140
ttttgctgca	caaatgggg	cataggcata	gagctagaca	atgatgtcaa	aagggataaa	1200
gtggaagacc	ttgtgcgcga	attgatgtct	ggggataaag	ggaaagagat	tatgaaaatg	1260
gctatggagt	ggaagaagct	ggccgaagag	tctgcccaga	gttcatcttt	taagaatcta	1320
gagaaagtga	ttcatgaagt	gcttttacca	ccactacaag	tgtgggatcc	taaggattcc	1380
acctaa						1386

&lt;210&gt;29

&lt;211&gt;1374

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1724

&lt;400&gt;29

atggaggaca	ctatcgttct	ctacgtttca	gcagagcacc	ttaactccat	gctactactc	60
ggcaactca	tcaacaaaca	ccacccaca	atctccgtcg	ccattatcag	caccgcccac	120

aacgccgccc	ctagttccgt	cgccgacgtg	gcggccatat	cttatcagca	actcaaaccg	180
gccactctcc	cttcggatct	aacccaaaac	ccaatcgagc	tcttcttcga	aatcccacgt	240
ctacataatc	ctaacttgct	cgaagcgtg	gaagaactgt	cactaaaatc	aaaagtaagg	300
gcattttgtga	tagatttctt	ttgcaatccc	gcattttgagg	tttcgactag	cttgaacata	360
cccacttact	tctatgtcag	cagcggcgcg	tttgggctat	gcgggttctt	gcattttccg	420
acaatcgacg	aaactgtcga	aaaagacatc	ggtgaactga	acgatatctt	ggagatcccc	480
ggttgccccc	cggttttgtc	ctcggatttt	ccgaaaggta	tgttctttcg	caagagtaac	540
acttacaagc	atTTTTtaga	cacggcgaaa	aacatgagga	gagcgaaagg	gatcgtggtg	600
aacgccttcg	acgcgatgga	gttccgagct	aaagaagccc	tcgtcaacaa	tctgtgcgta	660
cccaattcgc	caactcccc	agttttctta	gtcggcccat	tggtcggagc	aagcacaact	720
acgaaaacca	caaacgaaca	gcacgaatgc	ttgaaatggc	tggacgtgca	gccagacaga	780
agcgtgatct	tcttatgttt	cggtaggagg	ggtttgttct	ccgcagacca	attgaaggaa	840
atcgcaattg	gtctggagaa	cagcggccac	aggttctctgt	ggtccgtgcg	ttgcccacca	900
agtaagccta	actcttataa	cactgatccg	gacctggacg	agctcctgcc	cgaggggttt	960
ttgtccagga	ccgagacccg	gggtttcgtg	atcaagtcgt	gggcgcctca	gaaggagggtg	1020
ctgagccatg	gcgcggttgg	agggttcgtg	acgcactgtg	ggaggagttc	gatattggaa	1080
gcggtgtcgt	ttgggggtgcc	gatgatcggg	tggccgatat	acgcggagca	gaggatgaat	1140
agggtgttca	tgggtggagga	gatgaaggtg	gcgttgcagt	tggatgaggt	ggaggaaggg	1200
ttcgtggcgg	cgggtggaatt	ggagaagaga	gtgaaggagt	tgatggattc	gaagaatggg	1260
agagcggtta	ggcagagagt	gaaggagatg	aaagtggcgg	ctgaggtggc	ggttgaaaag	1320
ggtggttcgt	cagttgtggc	gttgcaacgc	tttgttgata	tgggtggttc	ttaa	1374

&lt;210&gt;30

&lt;211&gt;1362

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1723

&lt;400&gt;30

atggaggcag	acaaagaaaa	tctcaagatt	ttaatgttcc	catggttggc	tcattggtcat	60
atatttccat	ttctttagct	agccaaaaga	atcttgaagc	gaaaaaactg	gcacatatatac	120
ttgtgtacca	cagccataaa	cttcagttct	atcaacaact	tcattgaaaa	atataagttg	180
gagaactcaa	tagaagtagt	agaactccat	atagaaccat	cccctgaact	tccacctcat	240
taccacacta	caaagaattt	gccaacaagt	ctcaattcta	ccctattaaa	ggccattcag	300
acgtcgaatt	cgagcttctc	agacatcatc	agaacattga	aacctgaact	agtgatatat	360
gatgtgtttc	aaccttgggc	tgccaagatt	gcttcctcac	aaggatttcc	tgctgtttat	420
ttttctagct	ttggaggggc	accattatca	cttatgcac	atcaccacac	gtacggaaaa	480
cccgaatttc	ccttccaagc	aatagtgtgt	gaggacatcg	aactggaaag	tttgctctct	540
ttgtttgatt	tcttgtatgc	caacataatt	gaagtggatc	aagattatct	ttttgggaat	600
ttcaagcaat	cttgtgagct	tgttttgtta	aagagtagta	aagggattga	gaggaagtac	660
atcgattatc	tttcatcttt	gtctcagaaa	aaaatattac	ctgttggacc	actagtcaca	720
gttgacaata	agaccaatga	ggagaattcc	gagatcatga	attggttgag	caagaaaaaa	780
caccattcaa	ctgtctacat	ttccttcggg	agtgaatact	tcctgtctaa	agaagagatt	840
gaagagatag	caaaagggct	tgagctttgt	gatgttaact	ttatatggat	catcagattt	900
ccagtgggag	tgaccgttaa	cttagaagaa	acactgcctc	aaggtttctt	tcaaaggggtg	960
aacgaacggg	ggatggttgt	ttcaggatgg	gcaccacaga	gcaacataatt	agcacatcca	1020
agcacaggag	gctttgtgag	tcactgtggg	tggagttcta	tcacagaaag	cgtatatattt	1080
ggtgttccgg	tcatagggat	ggcaatgaaa	cttgatcagc	caataaacgc	cagaatgtta	1140

tcagaggctg	gtagtttgt	cgaagtcaaa	agatatgaaa	atgaagtgtt	taggggagaa	1200
gagatagcga	aggcgataaa	gaaggtgatt	gttgaggaca	gtggagaaag	gctgcggcaa	1260
agagcttttag	aattgagcga	gaagatgaaa	atggaagagg	aaaatgagat	ggatgaagta	1320
actgagcagc	tgtgggagct	ttgcttgacg	aaaaaacggt	aa		1362

&lt;210&gt;31

&lt;211&gt;1437

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1719

&lt;400&gt;31

atggaacctc	atatagttat	attccccgttc	atgtccaaag	gccacacaat	ccctctcctc	60
cacctctccc	acctcctcct	tagtcgcgga	gtacgcgtaa	cgatcttcac	cactgcacaa	120
aaccaccctt	tcatcgctca	acatgtccca	aaaacaaata	atgttaccat	cattgaccta	180
ccgttccctg	ataacatccc	tggaatttca	ccaggaacgg	agagcacgga	caaactcccc	240
tcgatgtctc	tcttcgtccc	gttcgtgaac	gccgctaaat	cgatgcaacc	gttcttcgaa	300
gatgagcttg	agaaaattca	ttcagggggt	agtttgtgtta	tatcggatgg	ttttcttcat	360
tggacgctga	aatcagcatc	caagttcgga	attccacgac	tgagtttcta	cggtatgagc	420
tactatgcct	tgacaatttt	tcgagtcgct	atctcaaaca	agttaatatc	attgcacgag	480
tcaccgcacg	aggcattcac	cttacctagt	tttccttggg	ttaaactcac	tagagatcac	540
ttcgacaaac	cacttgatca	acgtgaacca	aatgggtccgc	aatttgactt	tttcatggaa	600
gcaacgacag	ctactgtgaa	tagctatggt	ttcttagtga	atagcttcta	tgagcttgaa	660
ccaactttcg	cggattacta	tgacaacaat	tacaaacca	aggcgtggag	gtcgggcct	720
ctctgcctcg	cacaaacgcc	aaagaatgat	aatctctcgt	cgaagcctga	gtggattcat	780
tggcttgacc	aaaagttgga	acaagatcgc	cctgttttgt	acattgcatt	cggatcacaa	840
gcagaaatta	cactagaaca	gttacatgaa	atctcacgag	ggttggaaga	gtcaaatgta	900
cactttttgt	gggttttaag	gaacaatgga	gttgaactaa	gtgatggatt	tgaagacagg	960
gttaagaata	gaggaattgt	agtaaaagaa	tgggttgatc	aaagagagat	tcttgaacat	1020
gaaagtgtaa	aaggctttct	aagtcattgc	ggctggaatt	cggtaatgga	aggtatatgt	1080
gcggagggtc	tgattcttgc	gtggccaatg	atagcggagc	aacacttgaa	tgcaaagatg	1140
gtgagtgaag	aaataaagat	tggtttgaga	gttgaaacgg	ttgatggaac	ggcaaaggga	1200
tttgtgactg	cggcgagttt	gacgaaggcg	gtgatggaat	tgatggaggg	tgagaagggg	1260
aaggaattga	gggagaatgt	gaagaaaagt	gcgggggcag	cgagggaagc	ggtggtggaa	1320
ggtggttcgt	cgtggaatgg	tttgaatgaa	ctcattgatg	aggtgtgtag	gcataaggaa	1380
atgagtggta	gttctaaagt	tgatgaaaac	aagagggaaa	ttaaggatat	taattaa	1437

&lt;210&gt;32

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1725-NcoI

&lt;400&gt;32

cccatgggag aagaatacaa gaaa

24



<210>33  
 <211>26  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer 1725-KpnI  
 <400>33  
 ggtacctata aaatttggtta gttaaa

26

<210>34  
 <211>1080  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>GAPDH  
 <400>34

caccgattac	atgacgtaca	tgttcaagta	cgacagtgtt	catggtcagt	ggaaacacca	60
cgagttgaag	gtacaggatg	agaagaccct	tctgtttggt	gaaaagccag	taagagtctt	120
gtcaactggg	gtcttcacgg	acaaagataa	ggctgctgct	cacttgaagg	gtgggtgcca	180
gaaggttgtg	atctcagcac	caagcaaaga	tgcaccaatg	tttgttgtgg	gtgtcaatga	240
gaaggaatac	aaaccagagt	tggacattgt	ttccaatgct	agttgcacta	ccaattgcct	300
tgcccctttg	gccaaaggtca	ttaatgatag	atttggaatt	gttgagggcc	tcatgaccac	360
cgtccactct	attaccgcaa	ctcaaaagac	tgtcgatggg	ccatcgagca	aggactggag	420
aggtggaaga	gctgcatcgt	tcaacattat	ccccagcagc	actgggtgcag	ctaaggctgt	480
tggtaaagtg	ctcccagttc	tcaatggaaa	gctaacggga	atggccttcc	gtgttcctac	540
tgtcgatgtc	tccgtagtgg	acctcactgt	caggctcgag	aaagaggcca	cttatgatga	600
gatcaaaagt	gctatcaagg	aggaatccga	gggcaacctt	aagggcattt	tgggctatac	660
cgaagatgat	gtgggtgtcaa	cagactttgt	tggtgatagc	cgatcaagca	ttttcgatgc	720
caaggctgga	attgcattga	gcaagacgtt	tgtgaagctt	gtgtcgtggg	acgacaacga	780
atgggggttac	agttcccgtg	tgatcgacct	gatcgtgcac	atggcctcag	tttctaaggc	840
ttgatcgatg	atctgccttag	gccgtgaagc	agcttttgtc	ttatcgcac	ttttctgagt	900
ttgtaataat	gggcctttgt	gttatattgca	gcctaatttt	gcagtttgca	aatttatggg	960
ttttgggttat	gttttgctga	aacctatatt	attacccttt	cgcgttgggt	tattgaatgt	1020
gaactctttt	tactgatgtg	tttaacgttc	tctcttttaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1080

<210>35  
 <211>20  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer AmGAPDH-F  
 <400>35  
 tgttgctggt aacgatccat

20

<210>36  
<211>18  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer AmGAPDH-R  
<400>36  
agctcttcca cctctcca

18

<210>37  
<211>24  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer AmAS-F  
<400>37  
atgttcaaaa atcctaatat ccgc

24

<210>38  
<211>25  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer AmAS-R  
<400>38  
ttagccatca agctcaatct tgaca

25

<210>39  
<211>16  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>M13 reverse primer  
<400>39  
aacagctatg accatg

16

<210>40  
<211>24  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer ThDFR-NcoI

&lt;400&gt;40

gctttacat ggagtaatga gctt

24

&lt;210&gt;41

&lt;211&gt;1367

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB266 (ThF3H)

&lt;400&gt;41

gtatgtatgt	atgtatgcta	tatacgagtc	gataaagttg	atcgttttca	ttttcgacaa	60
atacaaacct	cgtgagagaa	tcttctcgat	catatggcac	gagcaggacc	actaaccta	120
acttcgctag	cgctcgagaa	atcgctgcat	gaaaagtta	taaggacga	agacgagagg	180
cctaacttag	catacgatca	atttagcagt	cagattccat	tgatctctct	ctctgggatc	240
gacgatgaat	gtaataagag	gaaagagctg	tgcaagagaa	tagcgcaggc	atgcgaagat	300
tggggatatt	ttcaagtgat	cgatcatggg	atcgatttga	aactcgtcaa	cgatatgact	360
cgtttggctc	gtgagttctt	cgatttgccc	gacgaagaga	agctgagggt	cgatatgtct	420
ggtgggagaa	aaggagggtt	cattgtttcg	agccaccttc	agggcgagggt	ggtccaagac	480
tggcgcgaga	tcgtgacctt	cttcacatac	cctatcaaag	gccgtgacta	ttccctgtgg	540
cccgcacaagc	ccgaggcatg	gcggggccgtg	acagagacct	acagctcgca	gctaattgtgc	600
ctgggctgca	aattgctagg	aatcctatcc	gaggcaatgg	gcctcgaaag	agaagcgctg	660
accaaggcct	gtctgaacat	ggaccaaaaa	gttgtggtca	acttttacc	aaaatgccct	720
cagcccaatt	tgacattggg	cctgaagagg	cactcggacc	caggtttgat	cactctgctg	780
tttcaggata	acgttggcgg	gcttcaagcg	actcgagacg	gcgggaagtc	gtggatcacg	840
gtccagccc	ttgagggtgc	attcgtggtc	aatcttggtg	attttgctca	ttacttgagc	900
aatggaagg	tcaagaacgc	ggatcatcga	gcggtggtga	attcaaacac	gaatagaatg	960
tcgatcgcga	cgttttcaaaa	cccatcgcca	gaggctatcg	tgtaccctct	caagatcgga	1020
gacgacggga	agcccattat	agaaaagccc	atcacttatg	gagaaatgta	caagaggaag	1080
atggctaaag	acattgaact	tgccaagctc	aagaagctag	ccaaggaaca	aaagttgcaa	1140
gaagaagttg	ttaataatgt	tgaagatcat	catcttaaca	atgggaaaac	ttaaataaggag	1200
gttaaggtct	ttaaggaaac	tgacgttgct	ttgtgattgt	tatatattct	ctatgtcgta	1260
ttcgtcttaa	ggttgtcaga	tgaaaatatc	gaccatgtta	ggtatttaat	ttatatgaat	1320
tgtattgcct	agtcggccat	attatgatta	aaaaaaaaa	aaaaaaa		1367

&lt;210&gt;42

&lt;211&gt;22

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer ThF3H-SalI-1

&lt;400&gt;42

ttctctgtcg acgccattg cc

22

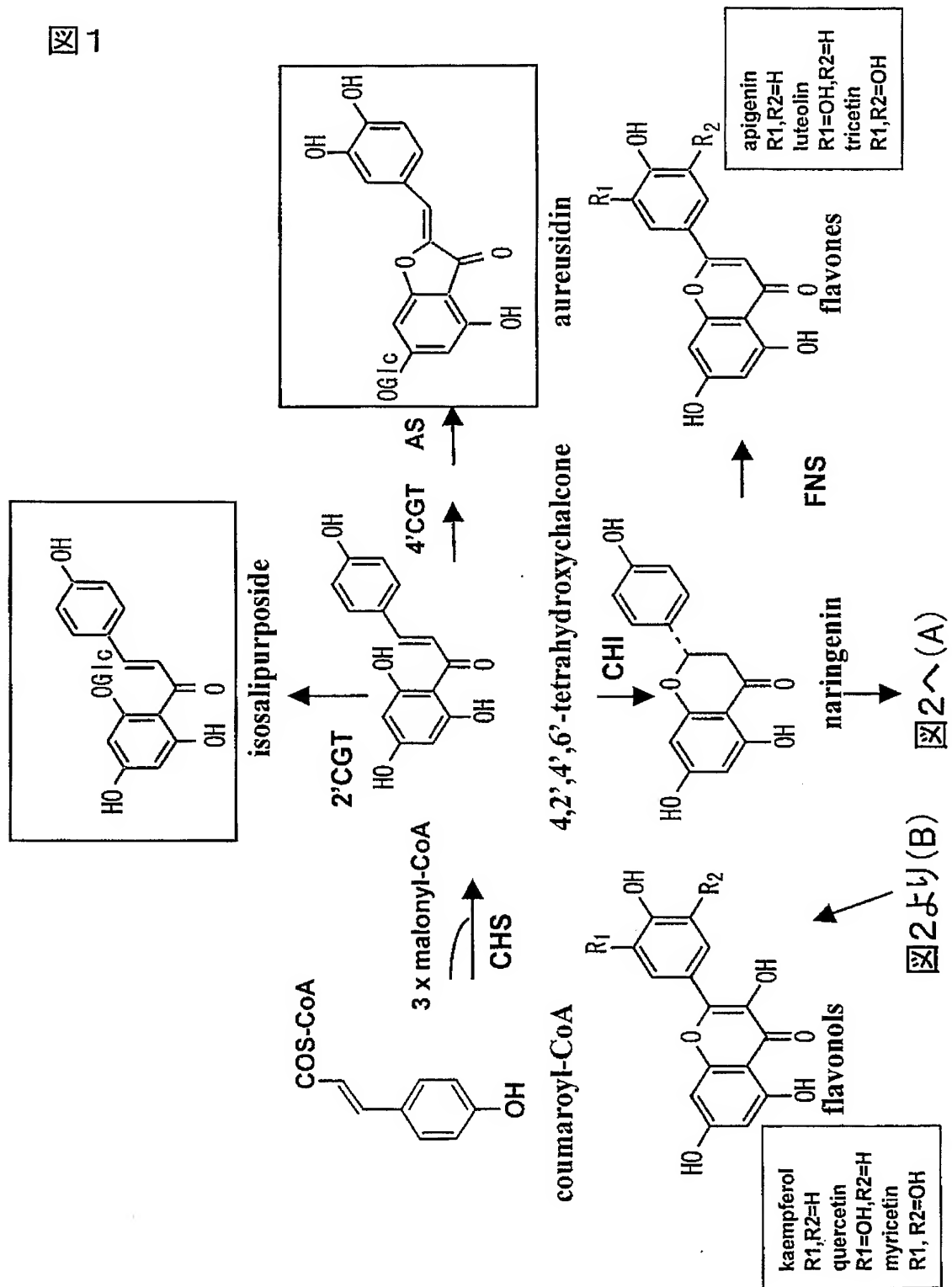
&lt;210&gt;43

<211>22  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer ThF3H-SalI-2  
<400>43  
cgccgtgtcg actcgcttga ag

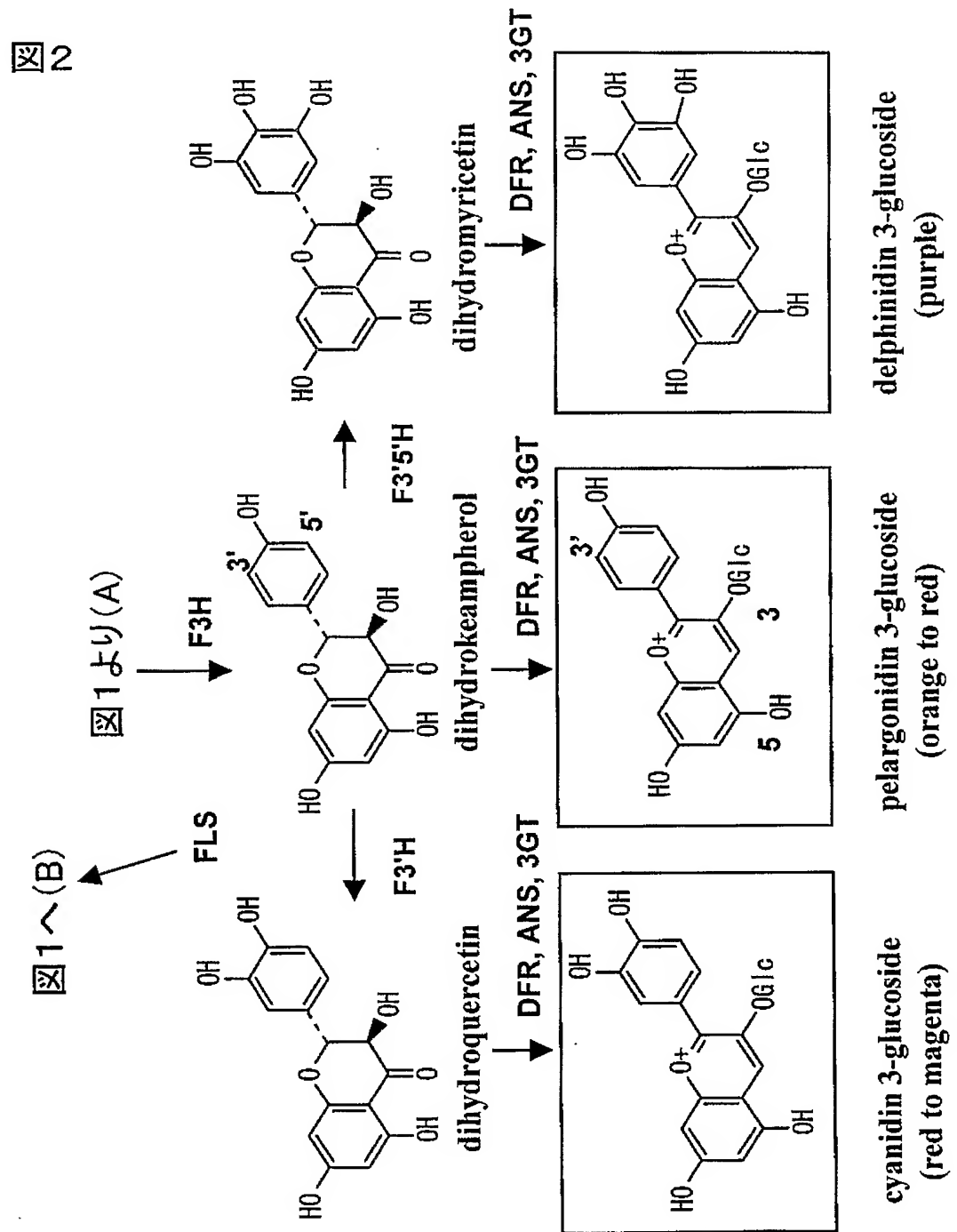
22

【書類名】 図面  
【図 1】

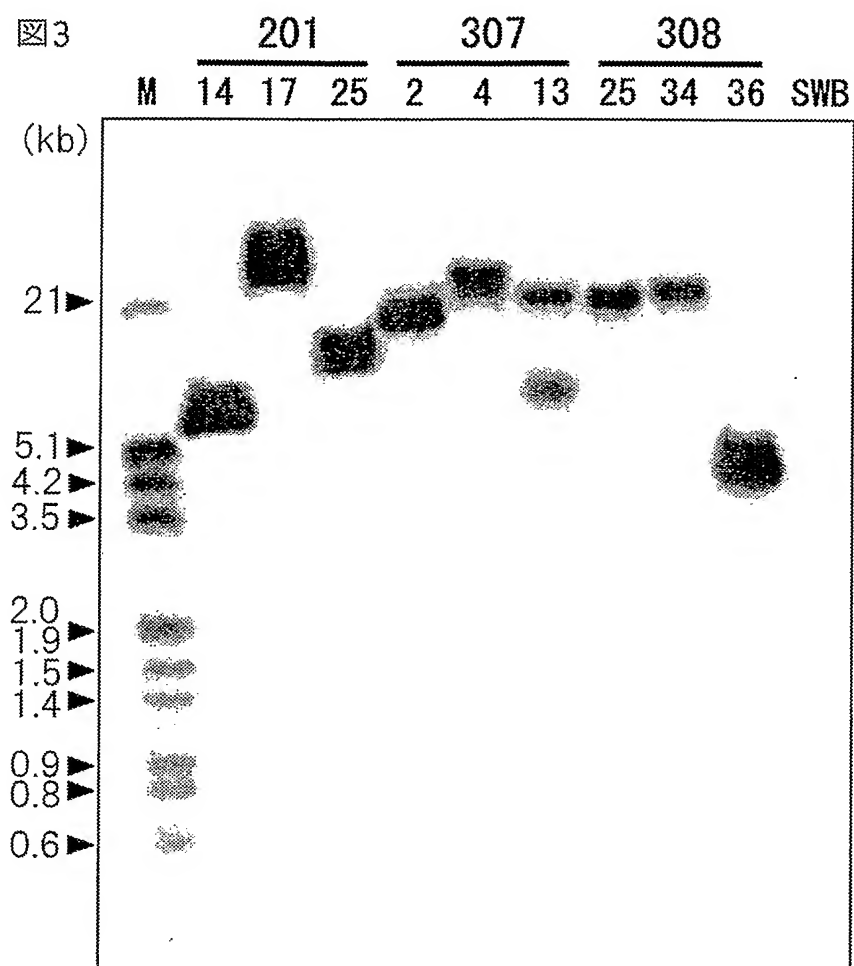
図 1



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カルコンの4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の提供。

【解決手段】 例えば、配列番号：2 に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を提供する。この4' 位CGT遺伝子とオーロン合成酵素を、本来オーロン合成能のない植物において共発現することにより、オーロンを蓄積することに成功し、花色が黄色味を帯びた色に変化した。さらに、両遺伝子の発現に加えて、宿主植物自身のフラボノイド色素合成系を制御することで、より鮮明な黄色の花を得ることができた。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 3 - 4 2 0 0 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 0 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4 0 号

氏 名

サントリー株式会社

特願 2 0 0 3 - 4 2 0 0 4 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 2 2 7 5 9 4 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 4 月 2 8 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区平河町二丁目 1 3 番 1 2 号

氏 名

サントリーフラワーズ株式会社